

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Cirugía



**ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON
ENFERMEDAD ATEROSCLERÓTICA
CORONARIA SOMETIDOS A CIRUGÍA DE
REVASCULARIZACIÓN MIOCÁRDICA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Manuel Carnero Alcázar

Bajo la dirección de los doctores

María Teresa Tejerina Sánchez
Fernando José Reguillo Lacruz
José Antonio González Correa

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-5508-1

© Manuel Carnero Alcázar, 2011

ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ATEROSCLERÓTICA CORONARIA SOMETIDOS A CIRUGÍA DE REVASCULARIZACIÓN MIOCÁRDICA



Tesis Doctoral

Departamento de Cirugía

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

Manuel Carnero Alcázar

Directores:

Doctora Doña María Teresa Tejerina Sánchez.

Doctor Don Fernando José Reguillo Lacruz.

Doctor Don José Antonio González Correa.

*A mis padres, Manolo y Cati;
y a mi hermana, Alba.
Mis seres más queridos.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerles a los directores de esta tesis el empeño que han depositado en su elaboración y corrección. Sin ellos, con su constante apoyo y aliento, todo este proyecto habría resultado imposible. Quiero agradecer a la doctora María Teresa Tejerina, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrática de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid, el haberme brindado la oportunidad única e irrepetible de participar en un proyecto ideado, auspiciado y patrocinado por el grupo liderado por su persona, y el haberme provisto de todos los medios humanos y técnicos para poder escribir este trabajo. Gracias por creer en mí desde el principio. Al Dr. Fernando Reguillo, Doctor por la Universidad Complutense de Madrid y Médico Adjunto Especialista de Área del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico San Carlos, quiero expresarle además de mi más sincera gratitud, la eterna deuda que con él contraí desde el momento en que lo conocí. Esta tesis y buena parte de lo que en un futuro sea o deje de ser, probablemente dependa de lo que él se ha preocupado por enseñarme a lo largo de los años. Al Dr. González Correa, Médico Especialista en Farmacología Clínica, Doctor y Profesor Titular de la Universidad de Málaga, quiero agradecerle el esfuerzo para que este proyecto se pudiese llevar a cabo desde la distancia y el tiempo. Muchas gracias, al Dr. Antonio Gordillo, por no olvidarte de nosotros.

Quiero agradecer el apoyo brindado desde el Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico San Carlos, dirigido por el Dr. Rodríguez Hernández para hacer posible esta tesis. No quiero dejar de nombrar a todos y cada uno de ellos pues todos han hecho posible que a lo largo de 5 años, me haya formado como cirujano e investigador

y haya crecido como persona: doctores Enrique Rodríguez, Ali Alswies, Jacobo Silva, Luis Maroto, Javier Cobiella, José Castañón, Fernando O'Connor, Enrique Villagrán, Victoria Alegría, Álvaro González y Lorena Montes.

No puedo dejar de dar las gracias al doctor Santiago Redondo por el enorme apoyo prestado desde los albores de este proyecto. Mucho de lo que hemos hecho en estos años sólo ha podido llegar a buen puerto por él. Gracias a todo el departamento de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid (especialmente a Fernando Ortego) por haber trabajado todos estos años para que esta tesis pudiera hacerse posible.

Quiero agradecer el interés, la colaboración y el apoyo a todo el personal de enfermería de quirófano, planta y UVI de Cirugía Cardíaca del HCSC.

Por último, quiero darles las gracias a mis padres, a mi hermana y a María. Los cuatro son tan autores de esta tesis como yo, puesto que lo mejor de mí está en esta tesis, y lo mejor de mí son ellos cuatro.

La elaboración de esta tesis constituye para mí un éxito y un motivo de orgullo. Quisiera hacer partícipes de ambos sentimientos a todas las personas que he nombrado y a otras, que el olvido o la ingratitud me han impedido recordar. Muchas gracias.

Índice.

Introducción.	14
1. Definición y epidemiología de la aterosclerosis.	15
1.1 Definición de aterosclerosis.	15
1.2 Epidemiología de la aterosclerosis.	17
1.3 Factores de riesgo cardiovascular.	18
1.3.1 Sexo y edad.	18
1.3.2 Historia familiar de cardiopatía isquémica.	19
1.3.3 Lípidos y lipoproteínas.	19
1.3.4 Hipertensión arterial.	20
1.3.5 Diabetes mellitus.	22
1.3.6 Obesidad.	23
1.3.7 Enfermedad renal crónica.	23
1.3.8 Tabaquismo.	24
1.3.9 Otros factores de riesgo cardiovascular.	25
1.4 Modelos de predicción del riesgo cardiovascular.	26
1.4.1 Puntuación de riesgo (Framingham Risk Score).	26
1.4.2 Otras escalas de riesgo.	27
2. Fisiopatología de la aterosclerosis.	31
2.1 Teorías del origen de la aterosclerosis.	31
2.2 Evolución de la aterosclerosis.	34
2.3 La cascada de la inflamación y el desarrollo de la aterosclerosis.	36
2.4 Las citoquinas como marcadores de inflamación vascular.	41
3. Estrés oxidativo.	44
3.1 Definición.	44
3.2 Especies reactivas de oxígeno (ROS).	47
3.2.1 Formación y destrucción de ROS.	47
3.2.2 Tipos de ROS.	49
3.2.2.1 H_2O_2 .	50
3.2.2.2 $OH\bullet$.	50

3.2.2.3	O^{2-} .	50
3.2.2.4	ONOO●.	52
3.3.	Factores de riesgo cardiovascular y estrés oxidativo.	52
3.3.1	Hipercolesterolemia.	52
3.3.2	Diabetes mellitus.	53
3.3.3	Hipertensión arterial.	54
3.3.4	Otros factores de riesgo.	55
3.4	Aterogénesis: cómo influye el estrés oxidativo.	58
3.4.1	La importancia de los sistemas enzimáticos oxidativos y antioxidantes en la aterogénesis.	60
3.4.1.1	Sistemas enzimáticos oxidativos.	61
3.4.1.1.1	NADPH.	61
3.4.1.1.2	Xantina oxidasa.	61
3.4.1.1.3	NOS.	62
3.4.1.1.4	Mieloperoxidasa.	63
3.4.1.1.5	Lipooxigenasa.	64
3.4.1.1.6	ROS mitocondriales.	64
3.4.1.2	Sistemas enzimáticos antioxidantes.	66
3.4.1.2.1	SOD.	66
3.4.1.2.2	Catalasa.	67
3.4.1.2.3	Glutación peroxidada.	67
4.	Tratamiento de la aterosclerosis coronaria.	70
4.1	Tratamiento médico de la enfermedad coronaria.	70
4.2	Tratamiento hemodinámico intervencionista.	72
4.3	Tratamiento quirúrgico.	73
4.3.1	Detalle histórico.	73
4.3.2	Indicaciones.	77
5.	Investigación traslacional.	82
	Hipótesis y Objetivos.	83
	1. Hipótesis.	84

2. Objetivos.	85
Material y Métodos.	86
1. Pacientes.	87
1.1. Selección de pacientes.	87
1.1.1 Criterios de inclusión.	88
1.1.2 Criterios de exclusión.	88
1.2 Técnica quirúrgica.	89
1.3 Extracción de muestras.	92
2. Descripción de las técnicas analíticas.	93
3. Material.	103
4. Método estadístico.	109
Resultados.	112
1. Descripción de la muestra.	113
1.1 Características demográficas y clínicas preoperatorios.	113
1.2 Características operatorias.	116
2. Perfil oxidativo pre y postoperatorio.	117
3. Factores de riesgo cardiovascular y perfil oxidativo.	118
4. Perfil oxidativo, riesgo quirúrgico y riesgo coronario.	126
Discusión.	128
Conclusiones.	144
Bibliografía.	146

ABREVIATURAS

AMI: Arteria Mamaria Interna.

ADN: Ácido DesoxirriboNucleico.

ACT: *Activated Clotting Time*.

ACV: Accidente Cerebro Vascular.

AP1: Proteína Activadora 1.

ARN. Ácido Ribonucleico.

ATP: Adenosín Trifosato.

BH4: Tetrahidro Biopterina.

CD: Arteria Coronaria Derecha.

CMLV: Células Musculares Lisas Vasculares.

COX: CicloOXigenasa.

CRM: Cirugía de Revascularización Miocárdica.

CX: Arteria Circunfleja.

DA: Arteria Descendente Anterior.

DM: Diabetes Mellitus.

eNOS: ÓxidoNitroSintetasa endotelial.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica..

FEVi: Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo.

FRS: *Framingham Risk Score*.

GC: Guanilato Ciclasa.

GPx: Glutati6n Peroxidasa.

GST: Glutati6n Total.

GSH: Glutati6n reducido

GSSG: Gluati6n Oxidado.

Hb: Hemoglobina.

HDL: *High Density Lipoprotein*.

H₂O₂: Per6xido de Hidr6geno.

ICAM: Mol6cula de Adhesi6n Intercelular.

IECA: Inhibidor del Enzima Convertidor de la Angiotensina.

IL: Interleucina/Interleukina.

IMC:  ndice de Masa Corporal.

INF: Interfer6n.

iNOS:  xidoNitroSintetasa inducible.

LDL: *Low Density Lipoprotein*.

MAPK: Prote n Quinasas Mit6geno Activadas.

MDA: Mal n dialdehido (p) plasmático y (h) en hematíes.

MCP-1: Proteína Quimiot ctica Monocitaria 1.

M- CSF: Factor Estimulante de Colonias Monocitarias.

MKP: MAP Kinasa.

MCP: Proteína Quimiot ctica de los Monocitos.

MM-LDL: LDL M nimamente Modificadas.

MMP: Matrix-Metalo Proteinasa

MnSOD: S peroxido Dismutasa Manganeseo.

NAD(P)H/NADPH : Nicotinamida Dinucle tido Fosfato Oxidasa.

NCEP: National Cholesterol Education Program.

NF  B: Factor Nuclear Kappa B.

NO :  xido Nítrico.

NOS: Óxido Nitro Sintetasa.

NYHA: *New York Heart Association*.

O₂⁻: Anión Superóxido.

ONOO●: Peroxinitrito.

OH●: Hidroxilo.

Ox-LDL: LDL oxidada.

PCR: Proteína C Reactiva.

PI3K: Fosfatidil Inositol 3 Quinasa.

PKC: Proteína Quinasa C.

PPAR: Receptor Proliferador Activado de Peroxisomas.

PSAP: Presión Sistólica de la Arteria Pulmonar.

RNS: Especies Reactivas derivadas del Nitrógeno.

ROS: Especies reactivas derivadas del oxígeno.

SIRS: Síndrome de Respuesta Inflamatoria Severa.

SOD: SúpeOxido Dismutasa.

TBARS: Sustancias Reactivas con el Ácido TioBarbitúrico.

TCI: Tronco Coronario Izquierdo.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

Th: Linfocito T helper.

VCAM: Moléculas de Adhesión Celular Vasculares.

INTRODUCCIÓN

1. Definición y epidemiología de la aterosclerosis.

1.1. Definición de aterosclerosis.

Aterosclerosis, palabra compuesta de dos vocablos griegos (*Atheré* = grumos o gachas y *skleros* = endurecimiento), es el término médico más aceptado para definir la patología oclusiva arterial que tiene como lesión característica la placa ateromatosa. No es sinónimo de Arteriosclerosis, término con significado más amplio que cubre todas las enfermedades que llevan al endurecimiento arterial, con o sin obstrucción, incluida la aterosclerosis nativa, la restenosis post-angioplastia y la enfermedad vascular del trasplante (*Falk y Fuster, 2004*). El término Aterotrombosis define el proceso de formación de la placa y los mecanismos por los cuales esta placa ateromatosa, mediante su ruptura y exposición del almacén lipídico que contiene, o solamente por erosión de su pared, ocasiona la formación de un coágulo sanguíneo que ocluye la luz de una arteria y produce el daño isquémico del tejido miocárdico irrigado por ella (*Fuster et al., 2005*).

Descrito por Heberden en 1770 (*Jay, 2006*), el cortejo sintomático de la angina de pecho o “dolor anginoso del corazón”, es solamente uno de los síndromes clínicos causados por la obstrucción ateromatosa de las arterias coronarias, cuya relación causal con el cuadro más avanzado de esta patología, el infarto o necrosis isquémica del tejido cardíaco, fue descrita hasta 1912 por James B. Herrick (*Herrick, 1912*).

Sin embargo, el paleontólogo A.T. Sandison, utilizando modernas técnicas de fijación y análisis anatómico-forense, determinó la existencia de evidencias histológicas de aterosclerosis con depósitos lipídicos y calcificación de la capa media en muestras de tejido procedentes de momias egipcias (*Sandison, 1962*), lo que demostró que esta patología ha acompañado a la humanidad por lo menos durante los últimos 3000 años (Figura 1). Aparentemente rara en la antigüedad, actualmente, la aterosclerosis es considerada un problema de salud por su alta frecuencia a nivel mundial que alcanza proporciones endémicas (*Armstrong, 2008, Libby, 2004*).

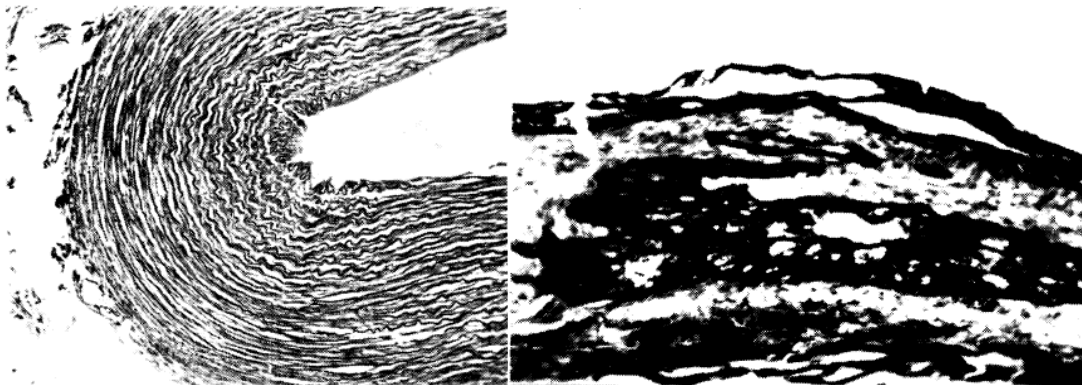


Figura 1. Cambios ateroscleróticos en arterias de momias egipcias.

Panel derecho: Calcificación de la capa media de una arteria tiroidea en una momia varón, tinción con hematoxilina-eosina x 420.

Panel izquierdo: Engrosamiento y cambios fibróticos en arteria carotida de una momia varón, tinción de Verhoef para fibras elásticas y colorante de Van Gieson X 160. De *Sandison, 1962*.

1.2. Epidemiología de la aterosclerosis.

La enfermedad aterosclerótica es muy común en la población general de los países desarrollados, y afecta a la mayoría de los adultos de más de 60 años de edad. Ninguna otra enfermedad es tan prevalente o tan costosa para la sociedad.

A pesar de la mayor esperanza de vida en los países desarrollados y de la menor incidencia de enfermedad cardio y cerebrovascular observada desde 1975, el número de muertes por cardiopatía isquémica y enfermedad cerebrovascular sigue siendo muy alto. En los últimos 20 años, aproximadamente un millón de estadounidenses ha fallecido por estas causas (*Cooper et al., 2000*). En España, desde hace tres décadas, la enfermedad aterosclerosa y sus complicaciones vasculares son la primera causa de mortalidad en varones y la segunda en mujeres. (*Yacer et al, 2001; Medrano et al., 2006*).

El riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerótica coronaria sintomática quedó reflejado en un registro de 7333 sujetos, de entre 40 y 94 años previamente sanos, en el *Frammingham Heart Study* (*Lloyd-Jones et al., 1999*). Dicho riesgo fue del 49% para los hombres y 32% para las mujeres a partir de los 40 años de edad. Aquellos individuos que permanecieron libres de enfermedad hasta la edad de 70 años, tuvieron un riesgo cardiovascular del 35% para los hombres y 24% para las mujeres a lo largo del resto de su vida. En España, un estudio de 2006 demostró que la tasa de accidentes cardiovasculares mayores era del 362 y 192 por 100000 personas – año a partir de los 25 años de edad (*Marin et al., 2006*)

Su frecuencia, junto con la de la obesidad y la diabetes, patologías con las que parece estar enlazada etiopatogénicamente (*Pradhan y Ridker, 2002*), ha aumentado en forma alarmante en los países en vías de desarrollo, como había sido pronosticado con anterioridad por King (*King et al, 1998*). Esto se ha hecho especialmente patente en los países que presentan el fenómeno de “occidentalización” acelerada (*Kattainen et al., 2006*). Éste parece ser secundario a los cambios en el patrón alimentario que acompañan al proceso de modernización y globalización de la sociedad actual (*Pereira et al., 2005*).

La expresión clínica de la aterosclerosis varía según el territorio afectado, y puede ser asintomática o presentarse en forma progresiva con disminución de riego sanguíneo en el órgano afecto, muerte súbita, infarto agudo de miocardio, daño renal o ictus cerebral (*Virmani et al, 2000*).

1.3. Factores de riesgo cardiovascular.

1.3.1 Sexo y edad.

Los factores de riesgo cardiovascular promueven la enfermedad coronaria en cualquier sexo y a cualquier edad pero con diferente fuerza: por ejemplo, la diabetes y los niveles bajos de colesterol HDL afectan con mayor fuerza a las mujeres (*Li et al., 2003*); el tabaquismo aumenta tres veces el riesgo de infarto en varones y seis en mujeres (*Prescott et al., 1998*); la dislipemia, la intolerancia oral a la glucosa y los

niveles de fibrinógeno tienen un menor impacto a medida que aumenta la edad, pero este menor riesgo relativo se compensa por el mayor riesgo absoluto en los adultos mayores (*Wilson y Kannel, 1993*).

1.3.2. Historia familiar de cardiopatía isquémica.

Los antecedentes familiares son un factor de riesgo independiente de la enfermedad coronaria, especialmente en los sujetos más jóvenes con historia familiar de enfermedad coronaria precoz (*Murabito et al., 2005*).

Los antecedentes familiares de cardiopatía isquémica fueron evaluados en un estudio prospectivo del *Physician's Health Study* en 22071 varones seguidos durante 13 años, y del *Women's Health Study* en 39876 mujeres seguidas durante 6 años. Comparando la ausencia de antecedentes familiares de infarto miocárdico, la presencia de estos antecedentes incrementaba de 1.71 a 2.05 el riesgo de infarto miocárdico (*Sesso et al., 2001*).

1.3.3. Lípidos y lipoproteínas.

Se han reconocido distintas anomalías lipídicas asociadas con un riesgo coronario aumentado: elevación de colesterol total y LDL colesterol en particular, niveles bajos de HDL colesterol, ratio colesterol total/colesterol HDL aumentado, hipertrigliceridemia, incremento de lipoproteína (a), apolipoproteína B aumentada y apolipoproteína A-I disminuida, diferentes genotipos de apolipoproteína E...

En el estudio INTERHEART, realizado en más de 52 países, la dislipemia, definida como un ratio apo B/apo A-1, supuso un 49% del riesgo atribuible poblacional del primer infarto miocárdico (*Yusuf et al., 2004*). Las anomalías del metabolismo de las lipoproteínas son habitualmente familiares. Por ejemplo, un 54% de todos los pacientes y un 70% de aquellos con anomalías lipídicas tenían algún trastorno hereditario en una serie publicada en los años 90 (*Genest et al., 1992*). La anomalía lipídica familiar más frecuente es el exceso de lipoproteína (a), la hipetrigliceridemia con hipoalfalipoproteinemia y la hiperlipemia combinada. Todas estas anomalías requieren la pertinente determinación y medición de lípidos y lipoproteínas. La resonancia nuclear magnética de protones con espectroscopia de las partículas lipoproteicas (un método de cuantificación lipídica alternativo) ha sido propuesta como un método alternativo de predicción de riesgo cardiovascular (*Mora et al., 2009*).

1.3.4. Hipertensión arterial.

La hipertensión es un factor de riesgo bien establecido de mortalidad coronaria y accidentes cerebrovasculares (*Miura et al., 2001; Lewington et al., 2002*). En el estudio INTERHEART, la hipertensión supuso el 18% del riesgo atribuible del primer infarto miocárdico (*Yusuf et al., 2004*). La hipertensión sistólica es un factor de riesgo tan potente como la diastólica, especialmente en pacientes añosos (*Franklin et al., 2001*).

El exceso de riesgo asociado a la hipertensión se hace más evidente en subgrupos de pacientes con otros factores de riesgo o con órganos diana dañados, y precisamente son estos individuos que más se benefician de la terapia antihipertensiva (*Chobanian et al., 2003*).

Un aspecto controvertido es el de la presión arterial límite recomendable para pacientes que se encuentran en un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular. Estudios epidemiológicos en la población general han demostrado que el riesgo cardiovascular aumenta progresivamente con presiones arteriales por encima de 110/75 (*Pastor-Barriuso et al., 2003*). Sin embargo, estas observaciones de estudios epidemiológicos no han demostrado causalidad. Los resultados de ensayos clínicos como el HOPE, EUROPA y CAMELOT sugieren que disminuir el límite de presión arterial máxima beneficia a los pacientes de alto riesgo (*Yusuf et al., 2000; Fox, 2003, Nissen et al., 2004*). Mientras que el HOPE y el EUROPA se verificaron que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) beneficiaban a los pacientes con riesgo cardiovascular por su efecto pleiotrópico; el CAMELOT y otros estudios sugirieron que el beneficio de dichos IECAs en pacientes de riesgo se debía a una disminución de la presión arterial. Así, en la población general se recomiendan presiones arteriales por debajo de 140/90, y en pacientes con enfermedad cardiovascular, se recomiendan presiones por debajo de 130/80.

1.3.5. Diabetes mellitus.

La resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia y la hiperglucemia se asocian a la aterosclerosis (*Kannel y McGee, 1979; Kannel y McGee 1979*). En un análisis de unos 13000 pacientes del *Copenhagen Heart Study*, el riesgo relativo de un infarto miocárdico o accidente cerebrovascular isquémico aumentaba de dos a tres veces, y dos veces de el muerte súbita en pacientes con diabetes tipo 2, independientemente de otros factores de riesgo cardiovascular (*Almdal et al, 2004*). Además, un número significativo de pacientes con infarto agudo de miocardio tenía diabetes no diagnosticada previamente. En el estudio INTERHEART, la diabetes representó el 10% del riesgo poblacional atribuible a un primer infarto miocárdico (*Yusuf et al., 2004*).

El riesgo de mortalidad por todas las causas asociado a la diabetes es comparable al mismo riesgo asociado a un infarto previo (*Vaccaro et al., 2004*). Sin embargo, las causas de muerte no son igualmente frecuentes en ambos grupos: la muerte cardiovascular es más frecuente después de un infarto, y la no cardiovascular es más frecuente en la diabetes. El informe de 2002 del National Cholesterol Education Program elevó la diabetes a la máxima categoría de riesgo, igualándola a un equivalente de enfermedad cardiovascular (*National Cholesterol Education Program (NCEP), 2002*).

Además de su importancia intrínseca como factor de riesgo cardiovascular, la diabetes suele asociar otros factores de riesgo como hipertensión, obesidad, ratio colesterol total/colesterol HDL, hipertrigliceridemia y fibrinógeno plasmático elevado. Las guías publicadas por el *National Cholesterol Education Program* y el sexto *Joint*

National Committee han insistido en un tratamiento más agresivo de los factores de riesgo cardiovascular en los diabéticos (*Miura et al., 2001; National Cholesterol Education Program (NCEP), 2002*).

1.3.6. Obesidad.

La obesidad se asocia a otros factores de riesgo de aterosclerosis, enfermedad cardiovascular y mortalidad cardiovascular. Estos incluyen hipertensión, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, HDL baja y niveles bajos de adiponectina (*Wolk et al., 2007*). Sin embargo, en un análisis de 4780 adultos del *Framingham Offspring Study*, la obesidad, determinada como un índice de masa corporal igual o mayor a 30 Kg/m², predijo una mayor incidencia de enfermedad coronaria independientemente del resto de factores de riesgo cardiovascular (*Wilson et al., 2008*).

1.3.7. Enfermedad renal crónica.

El riesgo coronario aumentado en los pacientes con enfermedad renal terminal ha sido descrito, pero hoy en día parece evidente que la disfunción renal leve y moderada también se asocian a un incremento sustancial del riesgo cardiovascular. Las guías de práctica clínica de *American College of Cardiology /American Heart Association Task Force* de 2004 recomendaron que la enfermedad renal fuese considerada como un equivalente de enfermedad cardiovascular (*Antman et al., 2004*).

La magnitud del riesgo asociado a la enfermedad renal fue evaluado en un análisis de los datos de más de un millón de pacientes no dializados ni sometidos a transplante renal asistidos en un sistema de salud único integrado (Go *et al.*, 2004). Aproximadamente un 18% de los pacientes tenían un filtrado glomerular estimado menor a 60 ml/m² por 1.73 m² de superficie corporal. Con un seguimiento mediano de 2.8 años, hubo 51.000 muertes, 138.000 eventos cardiovasculares y 554.000 hospitalizaciones. Comparados con un filtrado glomerular por encima de 60, los riesgos relativos estimados para cualquier evento cardiovasculares para aquellos con filtrados glomerulares entre 45 y 59, 30 a 44, 15 a 29 y menos de 15 fue de 1.4, 2, 2.8 y 3.4 respectivamente.

1.3.8. Tabaquismo.

Fumar cigarrillos es un factor de riesgo importante y reversible. La incidencia de infarto miocárdico aumenta 6 veces en mujeres y 3 en varones que fuman al menos 20 cigarrillos al día comparados con pacientes que nunca fumaron (Precott *et al.*, 1998). En el estudio INTERHEART, el tabaquismo supuso un 36% del riesgo poblacional atribuible a un primer infarto miocárdico (Yusuf *et al.*, 2004).

El riesgo de infarto miocárdico aumenta en los consumidores de tabaco, pero es mayor en los que inhalan el humo que en los que no lo hacen (Prescott *et al.*, 1998). Por otro lado, el riesgo de un infarto recurrente en un estudio de fumadores que habían tenido un infarto, cayó un 50% en el primer año después del cese del consumo

tabáquico, y se igualó al de los no fumadores al cabo de dos años (*Wihelmsson et al., 1975*).

1.3.9. Otros factores de riesgo cardiovascular.

Existe cada vez más evidencia que el consumo de frutas y vegetales está inversamente relacionado con el riesgo coronario y de accidente cardiovascular (ACV) (*Vanharanta et al., 2003; Yusuf et al., 2004*). En un metaanálisis de siete cohortes prospectivas que incluía unos 230.000 hombres y mujeres, el riesgo de ACV se reducía en un 11% por cada pieza de fruta adicional al día (*Dauche et al., 2005*).

El consumo moderado de alcohol tiene un efecto protector sobre la enfermedad coronaria (*Thun et al., 1997; Yusuf et al., 2004*). En un estudio prospectivo de 490.000 hombres y mujeres en Estados Unidos, el riesgo relativo de muerte por enfermedad cardiovascular en bebedores moderados respecto de no bebedores fue de 0.7 para hombres y 0.6 para mujeres (*Thun et al., 1997*). Este efecto beneficioso parece deberse a un aumento de los niveles de HDL.

El déficit de estrógenos tras la menopausia en mujeres también se asocia a un mayor riesgo cardiovascular. Inicialmente, se creyó que la terapia hormonal sustitutiva podría subsanar este exceso de riesgo. Sin embargo, esta sospecha no fue confirmada por el *Women's Health Initiative* (prevención primaria) ni por el *HERS* (prevención secundaria) (*Rossouw et al., 2002; Grad et al., 2002*).

La proteína C- reactiva predice el riesgo a largo plazo de sufrir un primer infarto miocárdico, cerebral o enfermedad arterial periférica. La determinación PCR mejora la estratificación de riesgo, sobre todo en aquellos pacientes con un riesgo intermedio de enfermedad coronaria (*Vasan et al., 2005*).

1.4. Modelos de predicción del riesgo cardiovascular.

A partir de estudios poblacionales se han desarrollado distintos modelos multivariantes de predicción de riesgo cardiovascular. Dichos modelos son capaces de predecir el riesgo cardiovascular a largo plazo (hasta 10 años).

1.4.1. Puntuación de Riesgo de Framingham (Framingham Risk Score (FRS)).

El primer FRS fue creado en 1998 e incluía la edad, el género, niveles de HDL, LDL, presión arterial, diabetes y tabaquismo. Este modelo originario era capaz de predecir el riesgo cardiovascular (coronario, cerebral o periférico) en un plazo de 10 años (*Wilson et al., 1998*). Un estudio de validación determinó que este modelo era capaz de predecir de forma precisa el riesgo en hombres, mujeres, blancos y afroamericanos (*D'Agostino et al., 2001*).

El FRS fue modificado en 2002 por la ATP III (*National Cholesterol Education Program, 2002*) (Tablas 1 y 2). Las modificaciones incluyeron la eliminación de la diabetes del algoritmo, pues fue considerada como equivalente a cardiopatía

isquémica, modificación de los rangos de edad, la inclusión del tratamiento de la hipertensión arterial como equivalente a ésta, y puntos específicos ajustados por la edad de tabaquismo y colesterol. Se definieron así tres grupos de riesgo según la puntuación de este Framingham /ATP III:

- Bajo riesgo: <10% de enfermedad coronaria en 10 años.
- Riesgo intermedio: 10- 20%.
- Alto riesgo: > 20%.

Los scores de riesgo de Framingham discutidos hasta el momento no incluían todas las posibles consecuencias adversas de la aterosclerosis como el infarto cerebral, la claudicación y la insuficiencia cardíaca. Estos eventos, sin embargo, si se recogieron en la puntuación de riesgo Framingham 2008 (*D'Agostino et al., 2008* (Tablas 3 y 4).

1.4.2. Otras escalas de riesgo.

Las escalas QRISK y QRISK2 se desarrollaron para predecir el riesgo cardiovascular en pacientes de distintas etnias del Reino Unido (*Hippisley-Cox et al., 2007; Hippisley- Cox et al, 2008*). Se añadieron variables como raza, status socioeconómico, historia familiar, diabetes, insuficiencia renal crónica, fibrilación auricular, etc. La escala Reynolds se desarrolló en Estados Unidos a partir de un estudio prospectivo de más de 10.000 americanos sin diabetes. Incluyó PCR como factor de riesgo y revascularización coronaria y muerte cardiovascular como eventos (*Ridker et al., 2008*).

Tabla 1 y 2: Puntuaciones Framingham /ATP III para hombres (izquierda) y mujeres (derecha).

Men

Estimate of 10-Year Risk for Men

(Framingham Point Scores)

Age

Points

20-34

-9

35-39

-4

40-44

0

45-49

3

50-54

6

55-59

8

60-64

10

65-69

11

70-74

12

75-79

13

Total Cholesterol

Points

Age 20-39

Age 40-49

Age 50-59

Age 60-69

Age 70-79

<160

0

0

0

0

0

160-199

4

3

2

1

0

200-239

7

5

3

1

0

240-279

9

6

4

2

1

≥280

11

8

5

3

1

Points

Age 20-39

Age 40-49

Age 50-59

Age 60-69

Age 70-79

Nonsmoker

0

0

0

0

0

Smoker

8

5

3

1

1

HDL (mg/dL)

Points

≥60

-1

50-59

0

40-49

1

<40

2

Systolic BP (mmHg)

If Untreated

If Treated

<120

0

0

120-129

0

1

130-139

1

2

140-159

1

2

≥160

2

3

Point Total

10-Year Risk %

<0

< 1

0

1

1

1

2

1

3

1

4

1

5

2

6

2

7

3

8

4

9

5

10

6

11

8

12

10

13

12

14

16

15

20

16

25

≥17

≥ 30

10-Year risk _____ %

Women

Estimate of 10-Year Risk for Women

(Framingham Point Scores)

Age

Points

20-34

-7

35-39

-3

40-44

0

45-49

3

50-54

6

55-59

8

60-64

10

65-69

12

70-74

14

75-79

16

Total Cholesterol

Points

Age 20-39

Age 40-49

Age 50-59

Age 60-69

Age 70-79

<160

0

0

0

0

0

160-199

4

3

2

1

1

200-239

8

6

4

2

1

240-279

11

8

5

3

2

≥280

13

10

7

4

2

Points

Age 20-39

Age 40-49

Age 50-59

Age 60-69

Age 70-79

Nonsmoker

0

0

0

0

0

Smoker

9

7

4

2

1

HDL (mg/dL)

Points

≥60

-1

50-59

0

40-49

1

<40

2

Systolic BP (mmHg)

If Untreated

If Treated

<120

0

0

120-129

1

3

130-139

2

4

140-159

3

5

≥160

4

6

Point Total

10-Year Risk %

< 9

< 1

9

1

10

1

11

1

12

1

13

2

14

2

15

3

16

4

17

5

18

6

19

8

20

11

21

14

22

17

23

22

24

27

≥25

≥ 30

10-Year risk _____ %

Adaptado del Adult Treatment Panel III en <http://www.nhlbi.nih.gov/>.
(National Cholesterol Education Program, 2002).

Tabla 3. Calculadora: Riesgo Framingham de enfermedad cardiovascular en 10 años para mujeres.

$$\text{RiskFactors} = (\ln(\text{Age}) * 2.32888) + (\ln(\text{TotalChol}) * 1.20904) - (\ln(\text{HDLChol}) * 0.70833) + (\ln(\text{SysBP}) * \text{SysBPFactor}) + \text{Cig} + \text{DM} - 26.1931$$

$$\text{Risk} = 100 * (1 - 0.95012^{e(\text{RiskFactors})})$$

Input:

Age

Sys BP

Total Chol

HDL Chol

On hypertension medication

Cigarette smoker

Diabetes present

Results:

Risk Factors

Risk

Decimal Precision:

Notas: Estimación del riesgo basado en análisis de riesgos proporcionados de Cox. Enfermedad cardiovascular incluye enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica e insuficiencia cardíaca. Adaptado de *D'Agostino et al., 2008*.

Tabla 4. Calculadora: Riesgo Framingham de enfermedad cardiovascular en 10 años para varones.

$$\text{RiskFactors} = (\ln(\text{Age}) * 3.06117) + (\ln(\text{TotalChol}) * 1.12370) - (\ln(\text{HDLChol}) * 0.93263) + (\ln(\text{SysBP}) * \text{SysBPFactor}) + \text{Cig} + \text{DM} - 23.9802$$

$$\text{Risk} = 100 * (1 - 0.88936^{e(\text{RiskFactors})})$$

Input:

Age

Sys BP

Total Chol

HDL Chol

On hypertension medication

Cigarette smoker

Diabetes present

Results:

Risk Factors

Risk

Decimal Precision:

Notas: Estimación del riesgo basado en análisis de riesgos proporcionados de Cox. Enfermedad cardiovascular incluye enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica e insuficiencia cardíaca. Adaptado de *D'Agostino et al., 2008*.

2. Fisiopatología de la aterosclerosis.

2.1. Teorías sobre el origen de la aterosclerosis.

Varias teorías han tratado de explicar el proceso de formación de la placa aterosclerótica. En 1856, Virchow, propuso la Hipótesis de respuesta al daño mecánico, basada en su observación de que los cambios degenerativos asociados con la arteriosclerosis podían ser reproducidos por la respuesta de cicatrización a un daño mecánico previo.

La Hipótesis Lipídica del origen de la aterosclerosis, propuesta en 1913 por Anitschkow (*Finking y Hanke, 1997*), sostiene que el desarrollo de la aterosclerosis es el resultado de la acumulación gradual de lípidos en la pared arterial, lo que sería responsable de la generación de los cambios tisulares característicos del ateroma. En modelos animales, la hiperlipidemia, ya sea como resultado de una dieta alta en grasas o por modificación genética, ocasiona en forma reproducible, el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Esta teoría se apoya también en evidencias que relacionan los niveles lipídicos elevados en suero con el riesgo de desarrollo de lesiones ateroscleróticas en humanos (*Berliner et al., 1995; Robbesyn et al., 2004*). Sus detractores opinan que este modelo es específico para cierta clase de acumulación lipídica sub-intimal vascular, pero no reproduce el daño, la ulceración y el grado de estrechamiento visto en la patología aterosclerótica más común y parece semejarse más a cuadros clínicos poco frecuentes de hiperlipidemias hereditarias (*Stehbens, 1999*).

La Hipótesis Trombogénica propone que las lesiones ateroscleróticas crecen por una incorporación gradual de trombos intraluminales en la pared arterial. Se apoya tanto en el hallazgo de fibrina y proteínas derivadas de plaquetas en placas ateroscleróticas en desarrollo y en lesiones maduras (*Bini et al., 1989 y Wilcox et al., 1988*), como en el hecho de que el trombo contiene cantidades elevadas de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), potente mitógeno para las células musculares lisas vasculares (CMLV). Sin embargo, esta teoría es difícil de comprobar dado que la infiltración de las placas ateromatosas por vasos sanguíneos inmaduros es común en lesiones avanzadas y en consecuencia se presentan hemorragias y trombosis dentro de ellas. Así, el trombo parece ser más un resultado tardío de la arteriosclerosis que un factor causante.

Russell Ross y John Glomset publicaron en 1973, una versión modificada de la hipótesis de respuesta a daño de Virchow (*Ross y Glomset, 1973*). Estos autores notaron importantes similitudes histológicas en placas “nativas” con cambios ateroscleróticos avanzados y aquellas provocadas por el daño causado al inflar un balón dentro de la luz arterial en aorta de monos. Ellos sugirieron que el ateroma era causado por una excesiva proliferación de CMLV en respuesta al daño endotelial. Esta idea ha sido revisada posteriormente y versiones subsecuentes de la teoría proclaman que la disfunción endotelial de cualquier causa, no necesariamente de origen mecánico, es crucial para el desarrollo de la lesión ateromatosa y mencionan que esta alteración en la funcionalidad endotelial es la característica más temprana de un proceso inflamatorio a este nivel (*Ross, 1986 y 1993*). Así, a partir de los trabajos de Ross (*Ross, 1999*), se aceptó la hipótesis de que la aterosclerosis es secundaria a un

proceso inflamatorio de baja intensidad y de evolución crónica, asociado a altos niveles de lípidos y de marcadores de inflamación inespecíficos circulantes. Sin embargo el mecanismo “disparador” del proceso inflamatorio es algo controvertido y causa de intensa investigación (*Libby, 2002; Tedgui y Mallat, 2001; Soliman y Kee, 2008*).

Los agentes que potencialmente parecen estar relacionados causalmente con este daño, son denominados “factores de riesgo cardiovascular”. Desde un punto de vista práctico, resulta útil agrupar los factores de riesgo cardiovascular estudiados en la literatura en dos grandes grupos: 1) los modificables mediante medidas higiénico sanitarias o farmacológicas; y 2) los no modificables. Tradicionalmente se han englobado dentro del segundo a la edad, el sexo y los factores genéticos; y dentro del primero a la hipercolesterolemia, la diabetes, la resistencia a la insulina, el tabaquismo, la hipertensión, el sedentarismo y la obesidad (*Libby, 2001; Retnakaran y Zinman, 2008*). En el estudio INTERHEART, llevado a cabo en más de 52 países, 9 factores de riesgo modificables aportaron más del 90% del riesgo atribuible a un primer infarto miocárdico (*Yusuf et al., 2004*): tabaquismo, dislipemia, hipertensión, diabetes, obesidad abdominal, factores psicosociales, consumo diario de frutas y verduras, consumo regular de alcohol y actividad física regular. Existe una gran evidencia derivada de estudios epidemiológicos en poblaciones humanas que apoya este concepto (*D’Agostino et al., 2001; Marrugat et al., 2003; McGill et al., 2008*). Sin embargo, los mecanismos de su acción a nivel celular y molecular se conocen sólo parcialmente.

Sin embargo, a medida que se van identificando nuevos factores de riesgo cardiovascular, esta clasificación va perdiendo consistencia. Así, hoy en día, el sexo y la edad tienen más relevancia como factores modificadores que como de riesgo. La proteína C reactiva y otros reactantes inflamatorios, inicialmente considerados como factores, hoy se evalúan como marcadores de riesgo. Los procesos bioquímicos que se alteran en el seno de la diabetes mellitus van más allá de los relacionados con el metabolismo de la glucosa y por ende controlables a primera vista. En efecto, el remodelado de la pared arterial, la implicación de factores de crecimiento, receptores de adhesión celular, interleukinas, las alteraciones del estrés oxidativo, etc. hacen de la diabetes una entidad difícil de encuadrar en la clasificación antes descrita. (*Retnakaran y Zinman, 2008; Dandona, 2008*).

2.2. Evolución de la aterosclerosis.

Las lesiones ateroscleróticas evolucionan durante muchos años y pasan a través de varias fases. Histológicamente, el cambio aterosclerótico más temprano es la acumulación subendotelial de macrófagos, transformados en *células espumosas*, y *linfocitos T*, lesión denominada *estría grasa*. Estas bandas grasas son asintomáticas y no estenóticas. Exámenes de autopsia han mostrado que estas pequeñas placas están presentes en la aorta al final de la primera década de la vida, en las arterias coronarias durante la segunda y que comienzan a estar presentes en la circulación cerebral durante la tercera década. Con el tiempo, las lesiones progresan y el centro de la placa

temprana presenta necrosis, acumula detritus, cristales de colesterol y células inflamatorias, sobre todo de tipo macrofágicas “espumosas”. Este centro necrótico permanece separado de la luz por una capa fibrosa “endotelizada” consistente en células musculares lisas vasculares inmersas en una matriz colágena extracelular. Las células inflamatorias también están presentes en la capa fibrosa, concentradas principalmente en los extremos de la placa, también llamados “hombros de la lesión”. El tipo de células en estos cúmulos son células T, células plasmáticas y especialmente macrófagos. Las lesiones avanzadas pueden llegar a ser extremadamente complejas, con evidencia de calcificación, ulceración, neovascularización y ruptura o erosión (Figura 2) (*Libby, 2002*). En conclusión, la composición de la placa aterosclerótica es variable y compleja, y es resultado de la interacción entre varios tipos celulares dentro de la placa, lo que determina la progresión, complicaciones y evolución clínica de la enfermedad (*Lusis, 2000; Choudhury, 2004*).

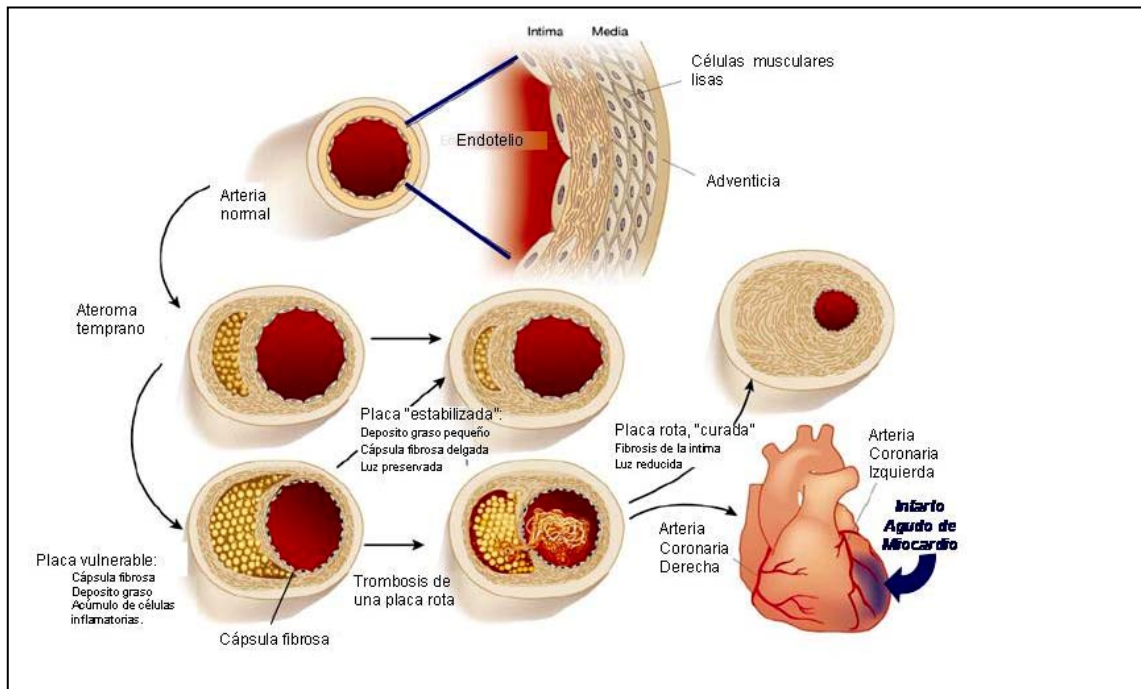


Figura 2.- Evolución esquemática de la lesión aterosclerosa en el humano, crecimiento de la placa, estadios estable, inestable y curación, evento miocárdico isquémico final. *Modificado de Libby, 2002.*

2.3. La cascada de la inflamación y el desarrollo de la aterosclerosis.

La activación de la cascada inflamatoria a nivel sistémico incluye la estimulación de macrófagos y linfocitos T y B por agentes agresores (trauma, bacterias, antígenos). La activación de estas células, ocasiona la secreción de linfoquinas, factores de atracción celular, la producción y activación de proteínas o ciclos enzimáticos que amplifican el fenómeno al ocasionar mayor secreción y la activación de estas mismas sustancias (*Packard y Libby, 2008*). La respuesta inicial depende de la identificación del

agente agresor por los receptores de membrana R-toll del macrófago y otras células sanguíneas circulantes. La etapa de amplificación es dependiente y mantenida por la estimulación de la producción de proteínas pro-inflamatorias por el hígado (*Nathan, 2002*).

La compleja interacción del tejido endotelial vascular y el sistema inmunológico en etapas tempranas del desarrollo de la placa aterosclerótica ha sido descrita por diversos autores (*Ross, 1999; Lüscher, 2000; Libby, 2002*). La fase inicial incluye la alteración de la adhesividad del endotelio vascular con los leucocitos circulantes, regularmente resistentes a ella (Figura 3). Este aumento en adhesividad es secundario a la expresión en la superficie endotelial de las moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1), que fijan a monocitos y linfocitos T al endotelio, que posteriormente se encontrarán en la placa de ateroma. Esta es la primera acción demostrable de la activación del sistema inmune y es, aparentemente, secundaria al reconocimiento de moléculas agresoras como colesterol de baja densidad oxidado, radicales libres, humo de tabaco y niveles elevados de homocisteína plasmática (*Alexander, 1994; Van Oostrom et al., 2004*). Estas células así “fijadas” al endotelio, migran al espacio sub-intimal haciéndose residentes y adquiriendo características morfológicas de macrófagos que posteriormente se transforman en células “espumosas” (*Packard y Libby, 2008*). Los macrófagos transformados son característicos de las placas ateromatosas. Dicha metamorfosis celular es posible mediante el aumento de la expresión de receptores para lipoproteínas modificadas como el receptor A y el CD36. Ya transformadas, estas células “espumosas” internalizan lipoproteínas modificadas como ésteres de colesterol, acumulándolas en forma de gotas citoplasmáticas. Estos

macrófagos ricos en depósitos lipídicos caracterizan las lesiones ateroscleróticas tempranas y secretan un número de factores de crecimiento y citoquinas pro-inflamatorias y quimiotácticas (quimiocinas) involucrados con el crecimiento de la lesión y sus complicaciones posteriores (*Packard y Libby, 2008*). Estas sustancias atraen y acumulan otro tipo de células inflamatorias como linfocitos T, B y células plasmáticas, que liberan más sustancias pro-inflamatorias y enzimas que destruyen la matriz de colágeno que rodea a las células musculares lisas para sustituirla por tejido fibrótico. Esto, a su vez, ocasiona una mayor acumulación de lípidos, y hace crecer la placa dándole la imagen de “depósito de desecho lipídico acelular, recubierto por una cápsula de células musculares lisas proliferativas”, imagen característica de las lesiones en etapa avanzada (Figura 4) (*Falk y Fuster, 2004*). El “debilitamiento” de la capa fibrosa que recubre la placa, su posterior fractura, la consiguiente activación del sistema de coagulación, formación de un trombo oclusivo intravascular y el desarrollo de un accidente isquémico, parecen ser secundarios al aumento de actividad de enzimas destructoras dentro de las cuales. La actividad aumentada de Matrix-Metallo-Proteinasa 9 (MMP-9), una colagenasa no constitutiva producida por células de músculo liso y macrófagos residentes en la placa ateromatosa, es motivo de intensa investigación. Esta enzima es considerada marcador de inestabilidad y riesgo de fractura de la placa (*Loftus et al., 2001*).

El mantenimiento del estímulo inflamatorio en forma crónica condiciona el crecimiento de la placa ateromatosa y su inestabilidad, dispara el proceso trombótico que conducirá a la oclusión del vaso o a la curación de la fractura con la liberación del

centro lipídico y su sustitución por matriz fibrosa que ocasiona el empeoramiento de la estrechez de la luz vascular.

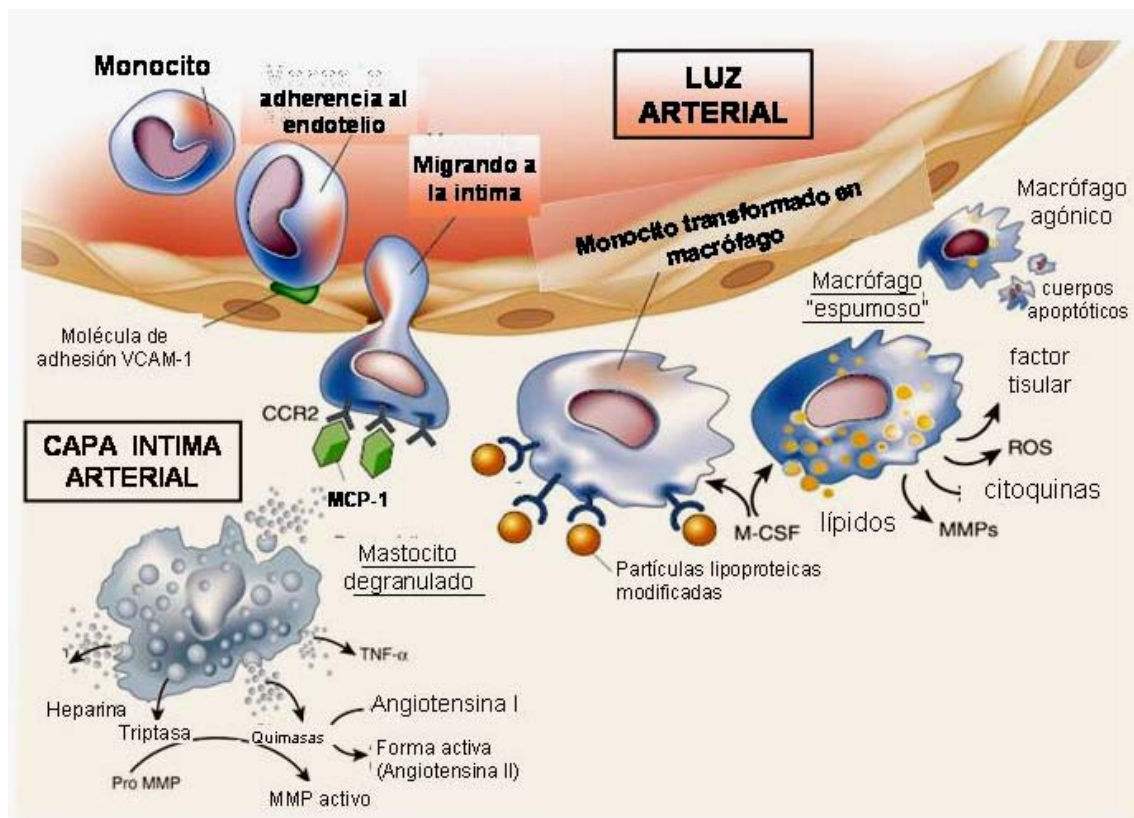


Figura 3.- Secuencia gráfica evolutiva de la etapa inicial de formación de una placa aterosclerótica, las células monocíticas circulantes son adheridas al endotelio por las moléculas de adhesión VCAM-1. Posteriormente migran a la capa íntima donde sufren una transformación a células macrófagicas que ingieren y almacenan las gotas de lípidos, y secretan moléculas pro-inflamatorias y quimiotácticas que ocasionan el acumulo de más macrófagos y otras células inflamatorias, como mastocitos que a su vez, liberaran mayor número de sustancias vaso y citoactivas.

VCAM -1 = Molécula de adhesión celular – 1

MCP-1 = Proteína Quimiotáctica de macrófagos – 1.

CCR-2 = Receptor de membrana de MPC -1.

MMPs = Metallo-proteinasas de matriz

ROS = Radicales oxidantes

M-CSF = Factor estimulador de formación de colonias de macrófagos

TNF α = Factor de necrosis tumoral α

Modificado de Libby, 2002.

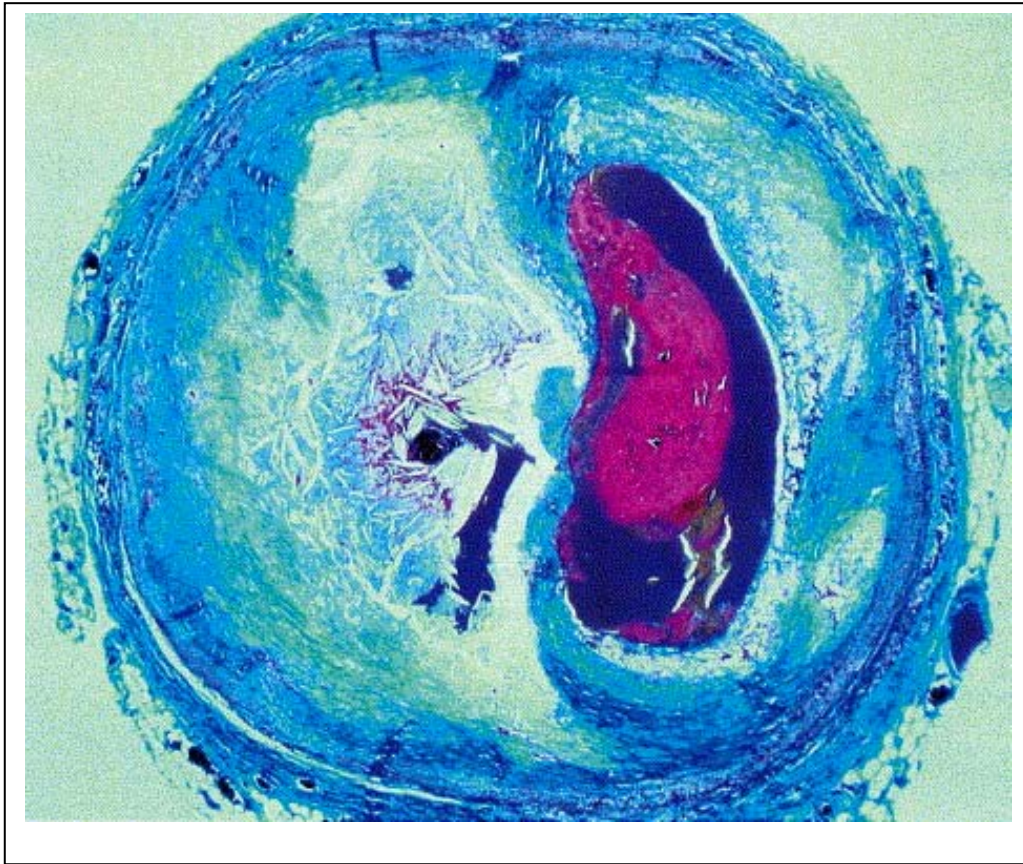


Figura 4. Corte transversal de una arteria coronaria con una gran placa ateromatosa (mitad izquierda), imagen de acumulación de desechos lipídicos cristalizados sin núcleos celulares en su interior, una cápsula de CMLV la cubre (en azul claro). Un trombo no oclusivo rico en plaquetas (en rojo), se adosa a la capa fibrosa. Tinción de tricrómico de Mason. *Falk y Fuster, 2004.*

2.4. Las citoquinas como marcadores de inflamación vascular

El término “citoquina” fue acuñado por Stanley Cohen en 1974 (*Cohen et al., 1974; Cohen, 2004*) y designa a un gran grupo de glucoproteínas que participan en la comunicación célula-célula (*Kishimoto et al., 1975*). Las citoquinas han sido convencionalmente clasificadas de acuerdo a la homología en la secuencia de sus aminoácidos y del complejo receptor al que se unen, en las seis familias siguientes (*Henderson y Higgs, 2000*):

- I). Interleucinas (IL).
- II). Familia de los factores de necrosis tumoral (TNF).
- III). Interferones (INF).
- IV). Factores estimulantes de colonias (FSC).
- V). Factores de crecimiento (FC).
- VI). Quimiocinas.

Se acepta que existe un gran solapamiento en las categorías. Esto ha generado sistemas de clasificación alternativos, de los que el más importante es el que subdivide a las citoquinas por su mecanismo de acción. Así, una clase son aquellas que tienen principalmente efectos pro-inflamatorios (IL-1, IL-8, IL-12, TNF e INF γ); y otra, anti-inflamatorios [IL-4, IL-10, IL-13 y el antagonista endógeno del receptor de IL-1(IL-1ra)]. También se define un grupo que coordina a las células “ayudadoras tipo I” (Th1, que

incluyen a IL-2, TNF e INF γ), o a las tipo II (Th2, que incluyen a IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) (Mallat *et al.*, 1999).

Las citoquinas que ejercen una función quimiotáctica se denominan quimiocinas. La existencia de múltiples clasificaciones de este tipo de moléculas es secundaria al gran efecto pleiotrópico de cada una de ellas. Se ha determinado que uno o varios miembros de cada familia participan en el desarrollo de la aterosclerosis y todos los tipos celulares presentes en la placa ateromatosa son capaces de producir y responder a mediadores citoquímicos (Von der Tüsen *et al.*, 2003; Tedgui y Mallat, 2006).

La vía de señalización de inflamación en el proceso aterogénico se inicia cuando los llamados factores de riesgo cardiovascular producen inflamación local (vascular) o sistémica (extra-vascular), que pone en marcha la cascada de citoquinas pro-inflamatorias primarias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la Interleucina-1 β (IL-1 β). Estos marcadores inflamatorios y las moléculas de LDLc-oxidado activan el endotelio y la expresión de moléculas de adhesión, paso crucial en el reclutamiento de células inflamatorias desde el torrente sanguíneo a la pared vascular. Las citoquinas primarias estimulan la producción de citoquinas quimiotácticas (quimiocinas), como Interleucina-8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), que reclutan monocitos en los sitios de inflamación. Su papel en las fases iniciales de la aterosclerosis cobra aún mayor importancia, pues estimulan la producción de Interleucina-6 (IL-6), una citoquina pro-inflamatoria secundaria cuya liberación es, a su vez, disparador de la “amplificación de la respuesta inflamatoria” mediante la producción por el hígado de proteínas o “reactantes de fase aguda”, como

la proteína-C reactiva (PCR), el amiloide sérico A y el fibrinógeno (*Saadeddin et al., 2002; Sukhija et al., 2007*).

Las mediciones de estas citoquinas en suero (Tabla 5), pueden dar información sobre el estado inflamatorio de un individuo a diferentes niveles y fases de la reacción inflamatoria aterosclerótica. (*Biasucci et al., 2004*)

1.- Citoquinas
a).- Citoquinas pro-inflamatorias primarias (TNF- α , IL-1)
b).- Citoquinas pro-inflamatorias secundarias (IL-6)
c).- Citoquinas quimiotácticas (MCP-1, IL-8)
2.- Moléculas de adhesión
a).- Selectinas (P-selectina, E-selectina, L-selectina)
b).- Moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1)

Tabla 5.- Marcadores de inflamación relacionados con la aterogénesis.
(Tomado de *Biasucci et al., 2004*)

3. Estrés oxidativo.

3.1. Definición.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) (hidroxilo ($\text{OH}\bullet$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-)), y del nitrógeno (RNS) (óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) y peroxinitritos ($\text{ONOO}\bullet$)) (las denominaremos para simplificar ROS) son moléculas reactivas derivadas de oxígeno y del nitrógeno que se producen en todas las células aerobias por distintas reacciones de oxi-reducción, y se caracterizan por tener electrones desapareados. Estas sustancias, en condiciones fisiológicas, participan en la respuesta inflamatoria defensiva frente a procesos infecciosos o inflamatorios; pero en circunstancias patológicas, puede aparecer una excesiva proliferación de ROS que puede conducir a la aparición de distintas entidades nosológicas como la aterosclerosis, el Alzheimer o la diabetes. Este desbalance a favor de una proliferación no compensada de ROS se denomina estrés oxidativo.

Algunas de estas especies son altamente reactivas, como el radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$); y otras, como O_2^- y $\text{ONOO}\bullet$, son menos reactivas. El H_2O_2 no es un radical libre puesto que no tiene electrones desapareados, pero se genera a partir de ellos. Las especies reactivas de oxígeno participan en los mecanismos de señalización celular, afectando así a las funciones celulares como son la contracción muscular, la expresión de genes, la proliferación, la migración y la muerte celular. Las ROS pueden actuar como segundos mensajeros actuando en cascadas de señalización en numerosos tipos

celulares. Los agentes oxidantes van a inducir un incremento en la fosforilación de tirosinas debido a una inactivación de las proteínas tirosín fosfatasas. Receptores como PDGF-R y EGF-R; y proteínas como Src, JAK2, STAT, Ras, Akt/PKB, con actividad tirosina quinasa, también son reguladas por ROS. Además, las proteínas- quinasas mitógeno activadas (MAPK) son proteínas sensibles al estado redox, y van a ser activadas por las especies reactivas de oxígeno, probablemente por inactivación de fosfatasas de las MAP quinasas (MKP), que son las proteínas que regulan su actividad (*Touyz, 2004*). Factores de transcripción como NF- κ B y el activador de la proteína 1 son redox sensibles y son activados por ROS. Estos factores de transcripción son responsables de la expresión de genes proinflamatorios como interleuquinas, moléculas de adhesión celular y proto-oncogenes (*Griendling et al., 2000; Touyz, 2004*) (Figura 5).

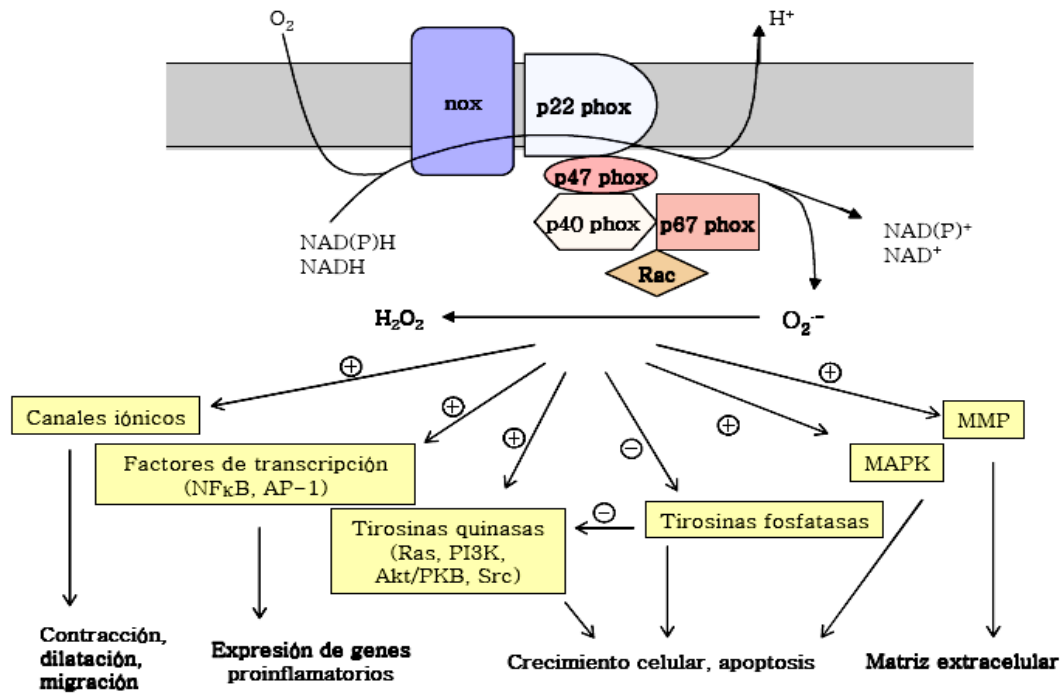


Figura 5: Vías de señalización dependientes de especies reactivas de oxígeno.

Akt/PKB: proteína kinasa AKT/PKB, AP-1: activador de la proteína 1, NFκB: factor nuclear κB, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, MMP: metaloproteínas, PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa. Modificado de *Griendling et al., 2000* y de *Touyz, 2004*.

3.2. Especies reactivas de oxígeno.

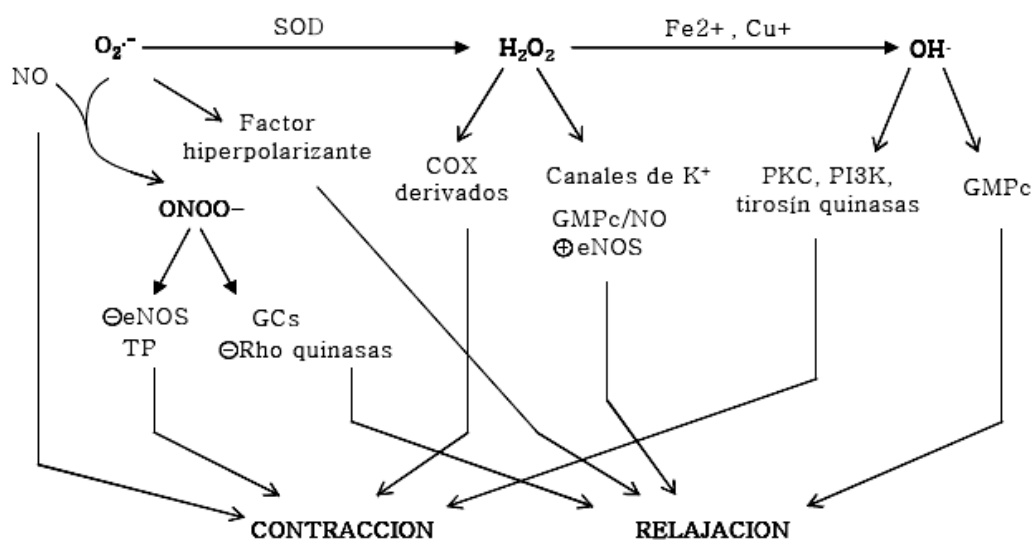


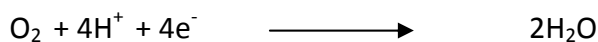
Figura 6: Mecanismos de contracción y relajación producidos por especies reactivas de oxígeno. COX: ciclooxygenasa, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, GCs: guanilato ciclasa soluble, GMPc: guanosín monofosfato cíclico, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, O₂⁻: anión superóxido, OH⁻: radical hidroxilo, ONOO⁻: peroxinitrito, PI3K:fosfatidil inositol 3 quinasa, PKC: proteína quinasa C, TP: receptor del TXA₂. (Modificado de *Belik et al., 2004*).

3.2.1 Formación y destrucción de ROS.

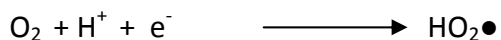
En términos generales, un radical libre es un átomo o molécula que en su orbital más externo posee uno o más electrones desapareados, situación energéticamente inestable, por lo que tiende rápidamente a reaccionar con otro átomo o molécula a fin de aparear su electrón y alcanzar la estabilidad.

Bajo este concepto, cualquier molécula puede ser un radical libre. No obstante, cuanto más pequeña sea, más capacidad de formación de radicales libres posee. En este sentido, es el oxígeno quien con mayor frecuencia e importancia biológica lo realiza. De ahí, que el término más comúnmente utilizado sea el de radicales libres derivados del oxígeno.

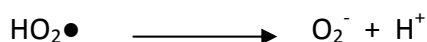
En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno molecular (95%) hasta agua, sin formación de intermediarios tóxicos, mediante la vía de la reducción tetravalente (*Romero et al., 1988*):



Sin embargo un pequeño porcentaje (5%), también puede reducirse por el aporte de un menor número de electrones, quedando su orbital externo con un electrón desapareado y por tanto formando un radical libre. Así, si se reduce por el aporte de un solo electrón, se forma el denominado *radical perhidroxilo* ($\text{HO}_2\bullet$),



Que se ioniza rápidamente formando el *anión superóxido* (O_2^-),

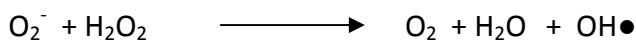


El cual se dismuta rápidamente a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en *peróxido de hidrógeno* (*Santrucek y Krepelka, 1988*):



El anión superóxido junto al peróxido de hidrógeno y un electrón daría lugar al *radical hidroxilo* ($\text{OH}\bullet$), el más reactivo de los radicales derivados del oxígeno, junto

con agua y oxígeno, reacción que está catalizada por iones de transición, fundamentalmente por Fe^{+++} o Fe^{++} ,



También se puede producir radical hidroxilo sin la presencia del anión superóxido, a través del sistema ferroso-férrico como transportador de electrones. Es la “Reacción de Fenton”.



Estos radicales libres se fijan a una cadena alquilo, originando la peroxidación lipídica (que desarrollamos más adelante), con formación de *radicales peróxido e hidroperóxido*.

Por tanto, a partir de la reducción parcial de la molécula de oxígeno se han formado en cadena diversos radicales libres.

3.2.2. Tipos de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

3.2.2.1. H_2O_2

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de dos moléculas de O_2^- a peróxido de hidrógeno y a oxígeno molecular (*Nordberg y Arner, 2001*). El H_2O_2 va a ser hidrolizado por la catalasa y por la glutatión peroxidasa (*Dhalla et al., 2000*); además, también puede ser precursor de otros radicales como el $\text{OH}\bullet$.

El H_2O_2 tiene múltiples acciones vasomotoras. Así, actúa como vasoconstrictor en algunos vasos como arterias renales (*Gao y Lee, 2005*); y como vasodilatador en

arterias mesentéricas (*Hayabuchi y et al., 1998*). Además, en arterias mesentéricas y aorta se han observado ambas acciones (*Gao et al., 2003; Gil-Longo y González-Vázquez, 2005*).

Por otro lado, el H_2O_2 modula o media la contracción inducida por vasoconstrictores como angiotensina II y serotonina (*Torrecillas et al., 2000; Srivastava et al., 2002*). También puede provocar vasoconstricción mediada por la liberación de productos derivados de COX, como el tromboxano (*Marín y Rodríguez-Martínez, 1995; Rodríguez-Martínez et al., 1998; Gao y Lee, 2001*).

En aorta de ratas Sprague-Dawley se ha descrito contracción inducida por H_2O_2 a través de un mecanismo dependiente del receptor de ATP (*Shen et al., 2000*).

3.2.2.2 $OH\bullet$.

El ión hidroxilo ($OH\bullet$) es considerado la especie más reactiva y perjudicial. Se genera a partir de H_2O_2 en una reacción catalizada por iones metálicos (Fe^{2+} , Cu^+) (*Nordberg y Arner, 2001*). También se puede generar a partir del H_2O por la acción de radiaciones electromagnéticas de baja longitud de onda y por la degradación del $ONOO\bullet$ (*Darley-Usmar y Halliwell, 1996*). El $OH\bullet$ puede inducir contracción en aorta de ratas por mecanismos dependientes de PKC, PI3K, proteínas tirosín kinasas (*Li et al., 2004*), así como mediar vasodilatación activando la GCs (*Marín y Rodríguez-Martínez, 1995*).

3.2.2.3. O_2^- .

El anión superóxido (O_2^-) se forma a partir del oxígeno molecular por adición de un electrón. No tiene capacidad de atravesar las membranas lipídicas, por lo tanto, permanecerá en el compartimento donde es sintetizado. El O_2^- es introducido por la cadena respiratoria mitocondrial, por flavoproteínas como la xantinaoxidasa, por ciclooxigenasa y lipoxigenasa, o por la NOS en determinadas condiciones de déficit de sustrato o cofactores. Sin embargo, la principal fuente de O_2^- en la pared de los vasos es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAD(P)H) oxidasa (*Cai et al., 2003*).

El O_2^- es una importante molécula de señalización intracelular que participa en la regulación del crecimiento y en los mecanismos de defensa de fagocitos. Así, las ROS van a inducir la apoptosis, expresión de moléculas de adhesión o angiogénesis en células endoteliales, y crecimiento, migración celular y expresión de genes implicados en la inflamación en células musculares lisas vasculares. NF κ B es uno de los factores de transcripción que se activa por O_2^- (*Taniyama y Griending, 2003*). Por otro lado, el O_2^- induce contracción vascular (*Tosaka et al., 2002; Didion y Faraci, 2002*), vasodilatación (*Marín y Rodríguez-Martínez, 1995*) y modula la contracción a diferentes agonistas (*Srivastava et al., 2002*). El O_2^- puede tener efectos contráctiles por su capacidad para inactivar el NO, vasodilatadores a través de la formación de ONOO●, que va a estimular la GCs y la formación de un factor relajante de naturaleza desconocida que abre canales de K^+ sensibles a glibenclamida (*Marín y Rodríguez-Martínez, 1995*) (Figura 6). La excesiva producción de O_2^- ha sido implicada en el desarrollo de la hipertensión y otras patologías cardiovasculares (*Dhalla et al., 2000*).

3.2.2.4. ONOO●.

Cuando los niveles de NO se incrementan hasta un rango del orden de nanomolar, éste compete con la SOD por el O_2^- , dando lugar a ONOO● (Wolin, 2000). La peroxidación de lípidos, el daño de la cadena de ADN o la nitrosilación de proteínas, son algunos de los efectos de este compuesto (Stoclet y et al., 1999).

Por otra parte, puede mediar vasoconstricción por un mecanismo dependiente del receptor del Tromboxano A₂, además de inhibir la actividad de eNOS, y mediar vasodilación por un mecanismo dependiente del NO⁺ y a través de la inhibición de Rho quinasas (Belik et al., 2004).

3.3. Factores de riesgo cardiovascular y estrés oxidativo.

3.3.1. Hipercolesterolemia.

En modelos experimentales con animales hipercolesterolémicos, se ha objetivado un incremento de la formación de superóxido, lo que podría contribuir a una disfunción endotelial (Ross, 1999). En pacientes con hipercolesterolemia, la reducción de la relajación dependiente del endotelio se asocia a un aumento en la formación de superóxido dependiente de la NADPH oxidasa vascular. La modificación de la LDL a ox-LDL ha demostrado potenciar esta respuesta. La formación incrementada de superóxido se debe, como vemos, a una inducción de la actividad de la NADPH oxidasa en respuesta a ox-LDL, que parece estar mediada por una sobreexpresión de

gp91phox (un dominio del enzima) en las células endoteliales. La formación de ox-LDL parece tener lugar en primera instancia en la íntima vascular, ya que mientras que en las fases iniciales es difícil detectarlas en sangre periférica, sí se encuentran con facilidad en la íntima de los vasos aterocleróticos (*Rueckschloss et al., 2001*). Por lo tanto, en los vasos hipercolesterolémicos, más LDL infiltran la íntima donde pueden ser oxidadas gracias al anión superóxido generado por las NADH oxidadas vasculares. La terapia antilipémica con estatinas (inhibidores de la HMGCoA reductasa) es capaz de disminuir la expresión de gp91phox, como se ha descrito en arterias mamarias de pacientes diabéticos con enfermedad coronaria (*Rueckschloss et al., 2001*).

3.3.2. Diabetes mellitus.

En la diabetes, la formación de ROS es una consecuencia directa de la hiperglucemia (*Brownlee, 2001*). La acumulación de radicales libres descrita en la diabetes puede da lugar a la glicación proteica no enzimática, la activación de la diacilglicerol- proteinkinasa C, la acumulación de sorbitol y la expresión de la transcripción nuclear del factor κ B de las células endoteliales (*Nishikawa et al., 2000*). Las ROS oxidan y dañan el ADN, proteínas y lípidos, jugando un papel importante en la patogénesis de las complicaciones tardías de la diabetes (*Nishikawa et al., 2000; Rosen et al., 2001*). Además, la diabetes se caracteriza por un declive de toda la actividad endógena antioxidante (glutación transferasa, glutación peroxidasa, glutación reductasa,...) (*Aydin et al., 2001; Soro-Paavonen et al., 2008*).

En la diabetes, por tanto se conjugan los dos factores principales de la formación de la estría grasa: la glicación no enzimática y la oxidación por el aumento de las ROS. La hiperglucemia mantenida produce una glicosilación no enzimática de las apolipoproteínas y de otras proteínas de la matriz que alteraría su función y aceleraría la aterogénesis (*Brownlee, 2001*).

Las lipoproteínas secuestradas dentro del espacio extracelular de la íntima, a salvo de los antioxidantes plasmáticos, se hacen muy sensibles a la modificación oxidativa. Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas no son homogéneas, sino que, en realidad, forman una mezcla variable y mal definida. Las modificaciones de los lípidos incluirían la formación de hidroperóxidos, lisofosfolípidos, oxiesteroles y productos aldehídicos de la degradación de los ácidos grasos. La palmitol-oxovaleroil-glicero-fosforil colina, la pelmitol-glicero-fosforil colina y la epoxiisoprostano E2-glicero-fosfocolina son algunos de los productos de la oxidación fosfolipídica. El 4-hidroxinonenol y el malón dialdehído (MDA) se formarían en base a la condensación de grupos aminos de los componentes proteicos de la lipoproteína con los lípidos oxidados (*Brownlee, 2001; Soro-Paavonen et al., 2008*).

3.3.3. Hipertensión arterial y estrés oxidativo.

Casi todos los estudios animales en varios modelos de hipertensión hereditaria y adquirida apoyan la existencia de una reacción causal entre estrés oxidativo e hipertensión (*Vaziri, 2002*). De hecho, en todos los modelos animales de hipertensión adquirida o hereditaria el estrés oxidativo se encuentra invariablemente presente

(Vaziri y Rodriguez-Iturbe, 2006); y se ha objetivado como el alivio del estrés oxidativo disminuye a tensión arterial (Rodriguez- Iturbe et al., 2007).

El aumento del estrés oxidativo genera hipertensión por diversos motivos, como el aumento de la síntesis de eicosanoides vasoconstrictores (tromboxano) o inactivación de NO mediada por ROS. La hipertensión genera, a su vez, un aumento en la síntesis de angiotensina II, que a su vez, promueve la síntesis de O_2^- a través de la NAD(P)H oxidasa (Taniyama y Griendling, 2003). Además, la formación de superóxido dependiente de la NADPH oxidasa podría mermar la biodisponibilidad de NO a través de la formación de $ONOO^-$, que a su vez potenciaría el efecto aterogénico de la angiotensina II (Davi et al., 2004).

3.3.4. Otros factores de riesgo.

El estrés oxidativo y la inflamación están íntimamente ligados. El aumento del estrés oxidativo promueve la activación de señales de transducción sensibles a cambios del equilibrio redox como la c-Jun N-terminal kinasa, proteína quinasa mitógeno-activada p38 (Hehner et al., 2000), factores de transcripción (proteína activadora 1 (AP-1) (Los et al., 1995), y factor nuclear kappa B. NFkB funciona como el factor de transcripción general para múltiples citoquinas proinflamatorias y proteínas de adhesión celular (molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) o molécula de adhesión vascular (VCAM-1)) (Polla et al., 1998). Todos estos fenómenos resultan en la activación, infiltración tisular y producción de ROS por leucocitos, CMLV, células endoteliales y fibroblastos. Así pues, el incremento del estrés oxidativo se traduce en

un aumento del estado inflamatorio que, a su vez, potencia la producción de ROS (Vaziri y Rodriguez-Iturbe, 2006).

Además de causar retención de sodio y vasoconstricción, la angiotensina II promueve la inflamación y el estrés oxidativo en el riñón y los tejidos vasculares. La activación del receptores 1 de la angiotensina II por la angiotensina II estimula la generación de O_2^- por la NAD(P)H oxidasa (Taniyama y Griendling, 2003). A la vez, la angiotensina II promueve la producción de citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular que producen inflamación y fibrosis (Ruiz-Ortega et al., 2000; Rodriguez- Iturbe et al., 2007).

La hiperhomocisteinemia se forma durante el metabolismo de la metionina y es un factor de riesgo conocido de la aterosclerosis (Lawrence de Koning et al., 2003). La hiperhomocisteinemia incrementa la expresión de TNF- α , que potencia el estrés oxidativo estimulando la actividad de la NAD(P)H oxidasa y de la iNOS. (Ungvari et al., 2003).

La prevalencia de la enfermedad coronaria aumenta con la edad. Con la edad, disminuye la capacidad proliferativa de las CMLV, confiriendo mayor inestabilidad a la placa ateromatosa. Además se observan niveles incrementados de los productos de oxidación lipídica como MDA y un mayor daño de ADN mitocondrial. (Kubovetz et al., 2003).

Un aumento del estrés oxidativo asociado a la obesidad se observó en el *Framingham Heart Study*, evaluado mediante la excreción de F2-isoprostanos. El tabaquismo contiene múltiples oxidantes; así los fumadores tienen una excreción

elevada de F2 isoprostanos y mayor daño de ADN mitocondrial. Los benzopirenos y los hidrocarburos aromáticos policíclicos contenidos en el humo del tabaco potencian la proliferación de las CMLV (*Keaney et al., 2003*).

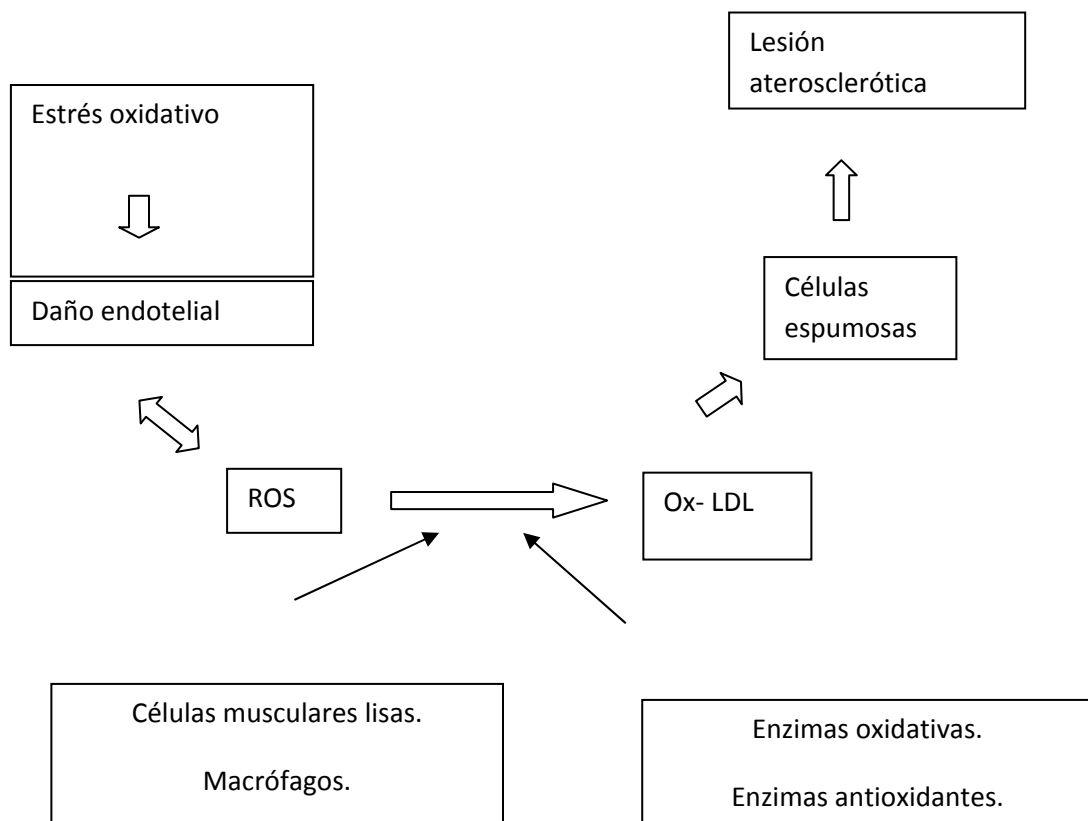


Figura 7. Mecanismos del daño vascular en el estrés oxidativo.

3.4. Aterogénesis: cómo influye el estrés oxidativo.

Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que los niveles aumentados de colesterol LDL promueven la aterosclerosis prematura. De acuerdo a la hipótesis de la modificación oxidativa, las partículas LDL no son aterogénicas en su estado nativo. La modificación más relevante biológicamente de las LDL es la oxidación. En una fase inicial, ocurre una oxidación leve de las LDL que resulta en la formación de las LDL mínimamente modificadas (MM-LDL) en el espacio subendotelial. Las MM-LDL no son tan aterogénicas como las LDL totalmente oxidadas. Así, las MM-LDL aún contienen esteroides de colesterol predominantemente, sus apoB todavía se fijan al receptor LDL y su incorporación por macrófagos no conduce a la formación de células espumosas (*Singh et al., 2005*). Sin embargo, las MM-LDL estimulan la producción de proteína quimiotáctica monocitaria 1 (MCP-1) que promueve la quimiotaxis monocitaria. Esto conduce a la fijación de los monocitos al endotelio y su migración al espacio subendotelial, donde MM-LDL favorecen la producción del factor estimulante de las colonias monocitarias (M-CSF). El M-CSF induce la diferenciación y proliferación de monocitos a macrófagos (*Singh et al., 2005*). El interés inicial en el papel de la oxidación lipídica en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas era debido a su incapacidad para modificar las LDL deficientemente para favorecer su incorporación por los macrófagos. La oxidación necesaria para que ocurra esto es significativa: en el momento en que las partículas se fijan a los receptores “scavenger” como el SR-A o el CD36, hasta el 50% del colesterol ha sido transformado en 7- ketocolesterol y otros oxisteroides. La mayoría de los grupos grasos insaturados están oxidados en una

mezcla compleja de productos y apoB se encuentra ampliamente fragmentada y aparecen modificaciones aldehídicas que resultan en la aparición de productos como MDA e hidroxinonenal. Así aparecen las LDL totalmente oxidadas (ox-LDL) (Figura 7), que no es reconocido por el receptor LDL, y es incorporado intensamente por receptores “scavenger” en macrófagos, acumulándose y transformándose en células espumosas (Witztum y Steinberg, 1991).

Las ox-LDL tienen distintos efectos biológicos: son proinflamatorias, inhiben la oxidonitrosintetasa endotelial (eNOS), producen vasoconstricción, estimulan citoquinas como la interleukina- 1 (IL-1) y aumentan la agregación plaquetaria. Las ox-LDL también incrementan la expresión de VEGF en los macrófagos y células endoteliales a través de la activación de la activación del receptor gamma proliferador activado de peroxisomas (PPAR- γ). Los productos derivados de las ox-LDL son citotóxicos e inducen la apoptosis. Las ox-LDL pueden estimular la síntesis del factor tisular y el inhibidor 1 del activador del plasminógeno. También inhiben la motilidad de los macrófagos bloqueándolos dentro de la pared arterial y la proliferación de las células musculares lisas. Todo esto conduce a un engrosamiento de la pared arterial, al aumento de las resistencias vasculares periféricas, a la hipertensión y a la aterosclerosis (Madamanchi et al., 2005).

Debido a su localización única entre la sangre circulante y la pared vascular, el endotelio juega un papel fundamental en el desarrollo y progreso de la aterosclerosis. Entre los factores que dañan el endotelio, las ROS están demostrando ser las mayores responsables de la disfunción endotelial (Rueckschloss et al., 2001).

3.4.1. La importancia de los sistemas enzimáticos oxidativos y antioxidantes en la aterogénesis.

La importancia de las ROS en la enfermedad vascular está clara, y por tanto, ha existido desde hace una década aproximadamente un particular interés en las fuentes enzimáticas que contribuyen a la producción y eliminación de radicales libres en la pared vascular. Diversos sistemas enzimáticos, con distintos sustratos y fuentes de electrones, parecen importantes en éste ámbito. (Figura 8)

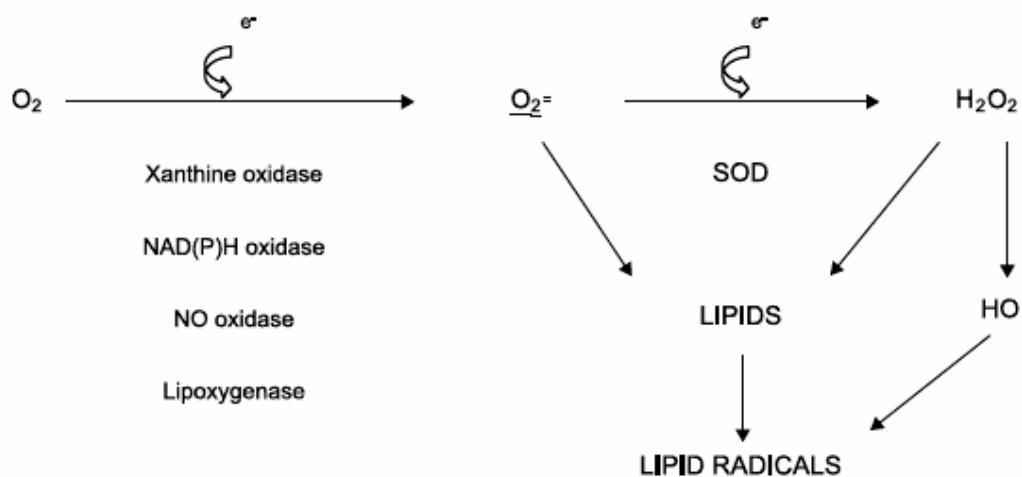


Figura 8. Formación de las ROS. Tomado de *Vogiatzi et al., 2009*.

3.4.1.1. Sistemas enzimáticos oxidativos.

3.4.1.1.1. Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfatasa-oxidasa. (NAD(P)H).

NAD(P)H oxidasa es una importante fuente de radicales libres en las células vasculares (Gusik *et al.*, 2000). Está regulada por distintos estímulos relevantes en la aterogénesis como la angiotensina II o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y el estrés mecánico vascular. La activación del receptor I de la angiotensina II induce la estimulación de la PKC, produciendo ésta un aumento de las ROS procedentes de la actividad de NAD(P)H, con el consecuente aumento de la presión arterial y vasoconstricción (Droge, 2002).

3.4.1.1.2. Xantina oxidasa.

Esta enzima está presente en el plasma y células endoteliales pero no en las células musculares lisas. En estudios experimentales con animales con hipercolesterolemia, esta enzima es capaz de producir un aumento de radicales libres, induciendo una disminución de la actividad de NO (Antoniades *et al.*, 2006). Se ha observado que en vasos de pacientes dislipémicos, la vasodilatación se mejora con la administración de alopurinol u oxipurinol, un inhibidor de esta enzima. En pacientes con síndromes coronarios, se ha registrado un aumento de los niveles de esta enzima, al igual que NAD(P)H. Además, en sujetos con dislipemia familiar se ha registrado un aumento precoz de la actividad de esta enzima (Spiekermann *et al.*, 2003).

3.4.1.1.3. Oxido nítrico sintetasa (NOS).

Las NOS son una familia de enzimas que catalizan la oxidación de L- arginina a L-citrulina y el potente vasodilatador NO^- . En el contexto de la aterogénesis, la eNOS y la iNOS son los más relevantes. La eNOS activa es un homodímero donde cada monómero con dominios reductores (donde se fijan NADPH; FAD Y FM), y dominios oxidativos (que contienen Zn, tetrahydrobiopterina (BH_4), hemo y L- arginina) que se unen a este domino a través de una calmodulina. En determinadas circunstancias, la eNOS puede quedar desapareada y convertirse en una importante fuente de ROS. En ausencia de cofactores como la tetrahydrobiopterina, la enzima puede reducir el oxígeno molecular en lugar de transferirlo a la L-arginina, dando lugar a O_2^- (Keaney, 2005; Bevers et al., 2006). NO^- reacciona rápidamente con O_2^- para generar ONOO^\bullet . La generación de ONOO^\bullet dentro del vaso produce una disfunción vascular a nivel endotelial y de las células musculares lisas, así como oxidación lipídica y proteica. Además ONOO^\bullet puede oxidar la BH_4 . Esto depleciona los niveles de BH_4 y potencia el desapareamiento de la NOS (Stocker y Keaney, 2001).

La forma iNOS se encuentra presente en las células musculares lisas y macrófagos activados. La expresión de iNOS está inducida por endotoxinas bacterianas y algunas citokinas. La actividad de la eNOS, al contrario que la iNOS está regulada por el calcio intracelular. El papel de la iNOS no está bien esclarecido (Murthy et al., 2004).

La hipercolesterolemia, la DM y la hipertensión arterial se asocian a un mayor desapareamiento de la NOS. Esto podría explicarse por una menor disponibilidad de BH_4 en estas circunstancias (Marinou et al., 2005). La producción de NO en las células

endoteliales necesita una determinada cantidad de BH₄ y su administración restaura la vasodilatación endotelio dependiente. Además, la L- arginina es también importante para la formación de NO y una adecuada función endotelial. En pacientes con aterosclerosis avanzada, la administración de L- arginina mejora la producción de NO y la vasodilatación. Finalmente, los niveles de dimetilarginina asimétrica (una sustancia que conduce a un desapareamiento de la NOS) están elevados en circunstancias como la hipertensión arterial. La administración de L-arginina en pacientes con niveles aumentados de dimetilarginina mejora la función endotelial (*Antoniades et al, 2009*).

3.4.1.1.4. Mieloperoxidasa.

Está producida por fagocitos activados y emplea el H₂O₂ para la producción de sustancias oxidativas más reactivas. Esta enzima, a través de la NAD(P)H, conduce a la producción de HOCl y sustancias análogas. Participa en el proceso de la ateromatosis induciendo modificaciones oxidativas en lipoproteínas de alta y baja densidad (*Daugherty et al., 1994*). En pacientes con síndromes coronarios, los niveles de esta enzima y sus productos parecen estar elevados. Al contrario que en los humanos, estos productos oxidativos parecen estar ausentes en animales de experimentación lo que apunta hacia una posible carencia de apolipoproteína E y receptores LDL. Los tres mecanismos por los que participa la mieloperoxidasa en la oxidación son: consumo de NO, oxidación LDL y reacción con la L- arginina para la producción de inhibidores de la NOS. Todos estos procesos dependen del H₂O₂. Estudios inmunohistoquímicos han

demostrado la presencia de mieloperoxidasa y HOCl en lesiones ateroscleróticas (*Pennathur et al., 2004*).

3.4.1.1.5. Lipooxigenasa.

Son enzimas que catalizan la incorporación de O₂ a ácidos grasos poliinsaturados, creando una familia de lípidos activos, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que participan en reacciones inflamatorias e incrementan la permeabilidad vascular. En modelos experimentales, la 15- lipooxigenasa induce la oxidación de LDL mediante reacciones enzimáticas y no enzimáticas (*Tousoulis et al., 2007*). 15 lipooxigenasa y 5 oxigenasa se expresan en las lesiones ateroscleróticas humanas y animales con deficiencia de apolipoproteína E. Animales con defecto de expresión de 5 o 15 lipooxigenasa están protegidos de lesiones aterogénicas como las encontradas en aquellos animales con defecto de apolipoproteína E y/o defecto del receptor de LDL.

3.4.1.1.6. ROS mitocondriales.

Las mitocondrias proveen energía (ATP) a las células mediante fosforilación oxidativa. Este es un proceso por el cual el ATP se forma a partir de la transferencia de electrones desde NADH al oxígeno molecular a través de unos transportadores de electrones de la membrana mitocondrial. La transferencia de más del 98% de los electrones por las cadenas de transportadores se emplea para la formación de ATP.

Menos de un 2% de los electrones escapan para formar O_2^- . Este O_2^- es neutralizado por la superóxido dismutasa manganeso (MnSOD). En condiciones aterogénicas, la transferencia de electrones puede derivar en un incremento de O_2^- . El DNA mitocondrial es muy sensible al daño oxidativo. Este daño se materializa en una disminución de la transcripción de ARN mitocondrial (Wallace, 1999). En experimentos en rata, se ha evidenciado que el daño del DNA mitocondrial se correlaciona con la extensión del daño aterogénico. (Wallace, 1999; Ballinger et al., 2002). El déficit de Mn-SOD favorece un aumento del daño mitocondrial y una progresión de la aterogénesis.

Las complicaciones diabéticas están íntimamente ligadas a la generación de O_2^- mitocondrial. La sobreproducción de O_2^- se ha asociado a cambios en la glicosilación y activación de la protein quinasa C (Aronson y Rayfield, 2002) en células vasculares. La sobreexpresión de SOD parece mejorar las consecuencias deletéreas de la hiperglicemia.

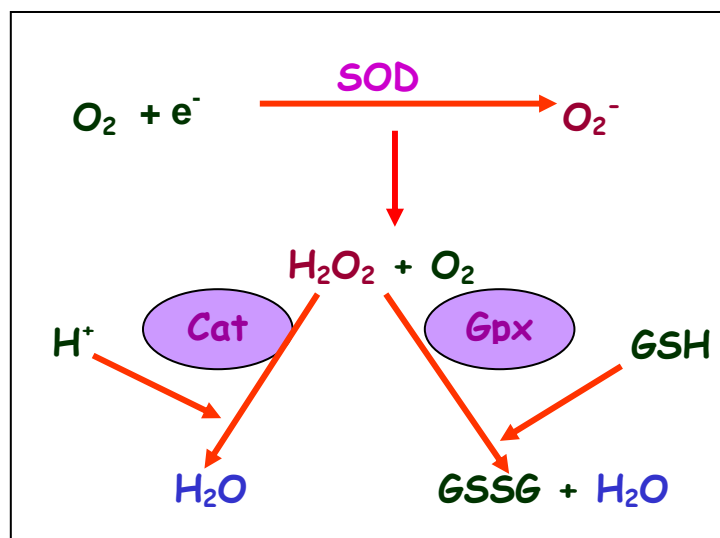


Figura 9: Sistema de defensa antioxidante.

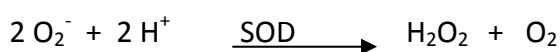
3.4.1.2. Sistemas enzimáticos antioxidantes.

Para combatir el estrés oxidativo, existen distintos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que protegen frente al efecto tóxico de los oxidantes (*Ruel et al., 2005*). Los mecanismos enzimáticos incluyen a la SOD, a la catalasa y a la glutatión peroxidasa (GPx); y los no enzimáticos al glutatión (GSH), la ubiquinona, los flavonoides, el alfa-tocoferol, el retinol y otros carotenos (*Urso y Clarckson, 2003*).

3.4.1.2.1. Superóxido Dismutasa

Es una enzima antioxidante de primera línea frente al estrés oxidativo. Existen tres tipos de SOD que han sido diferenciadas según su contenido en metal: cobre/zinc, manganeso y hierro. La SOD se encuentra ampliamente distribuida por el organismo, y en el ser humano se encuentra en tres formas distintas: citosólica, extracelular y mitocondrial (Mn-SOD, rica en manganeso) (*Sandstrom et al., 1994*)

Sea cual sea el origen del electrón aportado, cuando se incorpora a la molécula de oxígeno, se forma el ya conocido radical superóxido (O_2^-) (*Clark, 1984*). Este radical puede reaccionar rápidamente con moléculas orgánicas y producir un daño reductor al liberarse del electrón sobrante. Existe una enzima, la superóxido-dismutasa (SOD), que acelera 10 veces la dismutación espontánea del anión. Esta enzima, en presencia de protones, facilita el paso de dicho anión a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (*Dalsing et al., 1983*).



El peróxido de hidrógeno no es un verdadero radical, pero si se dejase reaccionar libremente daría paso a otros radicales mucho más reactivos.

Se he detectado que en pacientes con enfermedad coronaria, existe una disminución significativa de la actividad de la SOD frente a pacientes controles (Sozmen *et al.*, 1998). La disminución en la actividad de SOD parece ser, paradójicamente, el resultado del efecto de un incremento de ROS. Así, parece que niveles bajos de O_2^- inducen la actividad SOD, mientras que niveles elevados del mismo radical inhiben la acción de esta enzima. Así, parece que SOD solo es capaz de frenar la producción de peróxido de hidrógeno cuando existen unas concentraciones no muy elevadas de anión superóxido; y su actividad enzimática queda mermada en niveles muy elevados de este último.

3.4.1.2.2. Sistema de la Catalasa

Esta enzima degrada al peróxido de hidrógeno transformándolo en agua (Otani, 1986). Está presente en el citosol, en las mitocondrias y otros gránulos, encontrándose en concentraciones bajas o ausentes en el plasma. La vida media de esta enzima al igual que la de la SOD es muy corta, por lo que deben ser fabricadas continuamente para mantener su concentración plasmática.

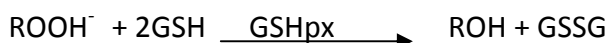
3.4.1.2.3. Sistema de la glutatión-peroxidasa

El glutatión constituye un elemento central en la defensa antioxidante (Viña *et al.*, 1992). Es un pequeño tripéptido constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina.

Es el grupo sulfhídrico de la cisteína, el responsable de la capacidad neutralizadora de los radicales libres. Se encuentra prácticamente en todas las células pero la mayor parte es sintetizado en el hígado. Es posible que el glutatión inhiba enzimáticamente la peroxidación, actuando a nivel de la glutatión peroxidasa unida a la membrana, que reduce los hidroperóxidos fosfolipídicos.

Son varios los sistemas enzimáticos que han aprovechado el enorme potencial reductor de este péptido: glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión transferasa:

- Actividad glutatión peroxidasa. Esta familia de enzimas cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH), a glutatión oxidado (GSSG) a expensas de ROOH^-



Estas enzimas pueden reducir tanto H_2O_2 como peróxidos orgánicos libres como los peróxidos de ácidos grasos. Existen 2 átomos de selenio ligados al centro activo en forma de selenio-cisteína. Tienen alta afinidad por sus sustratos pero baja capacidad de reacción. La glutatión peroxidasa está localizada en el citosol de las células, diferenciándose dos tipos:

- Glutatión peroxidasa dependiente de selenio, que es un tetrámero de cuatro subunidades presente en el citoplasma de las células eucariotas mayoritariamente, y en menor grado dentro de las mitocondrias. Es posible localizarla en varios órganos aunque su actividad más alta es en el hígado.

- Glutatión peroxidasa independiente de selenio (también se le puede denominar glutatión transferasa). Constituye un grupo de isoenzimas diméricas cuya distribución

es citosólica y mitocondrial. Tienen baja actividad frente a los peróxidos orgánicos, y nula frente al H_2O_2 . Su papel parece estar más relacionado con reacciones de biotransformación de xenobióticos y detoxificación de carcinógenos.

- Otras enzimas relacionadas pero de menor importancia son la glutatión reductasa y la glucosa 6-P deshidrogenasa, que contribuyen al sistema defensivo antioxidante, proporcionando GSH para la actividad glutatión peroxidasa la primera, y NADPH para la actividad glutatión reductasa la segunda. La localización de la glutatión reductasa es idéntica a la de la glutatión peroxidasa; la de la glucosa 6-P deshidrogenasa es citosólica.

Estos sistemas antioxidantes son insuficientes en condiciones que dan lugar a la producción de radicales libres en gran cantidad como la exposición ionizante, infecciones, determinadas toxinas y en la isquemia, sobre todo si ésta se sigue de reperusión. En estos casos, los radicales libres son un importante mecanismo productor de daño tisular, siendo uno de los principales órganos diana la fracción lipídica de la membrana.

4. Tratamiento de la aterosclerosis coronaria.

4.1. Tratamiento médico de la enfermedad coronaria.

Como norma general, es el primer tratamiento a realizar cuando aparecen las manifestaciones clínicas de la cardiopatía isquémica. El objetivo del tratamiento médico consiste en controlar los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de la cardiopatía isquémica y disminuir el consumo de oxígeno por parte del miocardio para evitar así las manifestaciones clínicas (*Fraker y Fihn, 2007*).

Los diferentes grupos de fármacos que se utilizan para el tratamiento de la cardiopatía isquémica son los siguientes (*Fraker y Fihn, 2007*):

1. - Nitritos: Son fármacos que producen una relajación general e inespecífica de la musculatura lisa vascular. Su mecanismo de acción se basa fundamentalmente en una vasodilatación del árbol vascular periférico produciendo una disminución de la precarga y de la postcarga, con lo que disminuyen el consumo de oxígeno al disminuir el trabajo cardíaco. Producen además un aumento del flujo coronario al dilatar los grandes vasos epicárdicos.

Los nitritos pueden de ser de acción rápida como la nitroglicerina y pueden ser administrados por vía intravenosa, transdérmica o sublingual, y los de acción prolongada como el dinitrato de isorbide.

2. - Bloqueantes beta–adrenérgicos: Son fármacos que actúan bloqueando de forma reversible, por un mecanismo de acción competitiva, los receptores beta-adrenérgicos de las células. El bloqueo beta reduce la demanda de oxígeno fundamentalmente por efecto tanto cronotrope como inotropo negativo. Al disminuir la frecuencia se prolonga la diástole y con ello el aporte máximo de oxígeno al miocardio. El número de moléculas que componen este grupo cada día es mayor, existiendo beta bloqueantes cardiosselectivos que evitan en buena medida los efectos periféricos de los fármacos de este grupo.

3. - Antagonistas del calcio: Son un grupo de fármacos que inhiben de forma no selectiva la corriente de entrada de calcio en las fibras cardíacas y en las fibras musculares lisas vasculares. El efecto antianginoso se consigue al disminuir las necesidades miocárdicas de oxígeno por reducir el tono arterial o postcarga, disminuir la resistencia coronaria y aumentar el flujo subendocárdico, siendo muy útiles en el tratamiento del espasmo coronario. Representantes de este grupo de fármacos son la nifedipina, el verapamil y el diltiazem.

4.- Otros: En este grupo estarían englobados todos aquellos fármacos utilizados en el control de los factores de riesgo cardiovasculares (antidiabéticos, hipolipemiantes, antihipertensivos, ansiolíticos), así como los fármacos antiagregantes plaquetarios y anticoagulantes.

En general el tratamiento médico de la cardiopatía isquémica se realiza con el uso de estos fármacos de forma escalonada. Aunque generalmente para el control de la

misma sea necesario aplicar la triple terapia (nitritos, beta-bloqueantes y antagonistas del calcio) así como aplicar terapia antiagregante o anticoagulante.

4.2. Tratamiento hemodinámico intervencionista.

El tratamiento directo de las lesiones oclusivas coronarias tiene dos vertientes. Una es la dilatación endovascular de las lesiones mediante balones de alta presión con o sin la implantación de mallas para evitar la reestenosis ("*stents*"), que ahora discutimos brevemente. La otra opción, es el tratamiento quirúrgico de la cardiopatía isquémica, que gracias a los avances de la anterior opción, hoy está reservada para las situaciones más demandantes desde un punto de vista técnico o cuando falla el tratamiento percutáneo.

El tratamiento de la cardiopatía isquémica mediante el intervencionismo ofrece unos resultados excelentes en grupos definidos de pacientes, teniendo una baja mortalidad y menos morbilidad que el tratamiento quirúrgico. El tratamiento mediante angioplastia con o sin *stent* (Figura 10) de las lesiones coronarias está indicado en casos de enfermedad coronaria no extensa (uno o dos vasos coronarios) y cuando ni el tronco coronario izquierdo ni el segmento proximal de la arteria DA tengan lesiones significativas. También está indicado como tratamiento de elección en el infarto agudo miocárdico con elevación del segmento ST o bloqueo de rama izquierda de nueva aparición. (*King et al, 2007; Kolh et al.2010*),

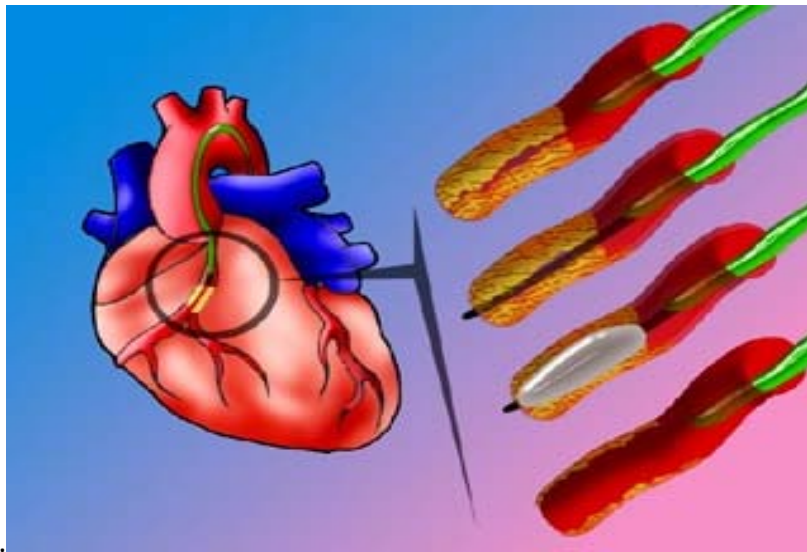


Figura 10. Dispositivo de angioplastia transluminal percutánea.

4.3. Tratamiento quirúrgico.

4.3.1. Detalle histórico.

El advenimiento y desarrollo de las técnicas quirúrgicas para el tratamiento de la cardiopatía isquémica mediante la revascularización coronaria supuso uno de los acontecimientos médicos más importantes del siglo XX.

El gran desarrollo de las técnicas de revascularización quirúrgica actuales se inició en los años treinta del siglo XX, con los trabajos pioneros de Claude S. Beck, quien utilizó técnicas operatorias de revascularización indirecta del miocardio a través

de crear adherencias pericárdicas por irritación mecánica o adosando quirúrgicamente el músculo pectoral mayor ricamente vascularizado al miocardio isquémico (*Beck, 1935*).

Murray desarrolló en los años 40 diversas intervenciones sobre las arterias coronarias. Fue el primero que realizó experimentalmente la reparación directa de lesiones coronarias mediante la interposición de segmentos venosos, siendo el precursor del puente aortocoronario (*Mueller et al., 1997*).

En 1951, en Montreal, Vineberg y Miller comunicaron la anastomosis de una arteria mamaria interna (AMI) izquierda al miocardio (*Vineberg y Miller, 1951*) (Figura 11). Una década después, el grupo de la *Cleveland Clinic* demostró que este procedimiento era capaz de aumentar el aporte sanguíneo al ventrículo izquierdo (*Effler et al., 1965b*). Sin embargo, la cantidad de flujo era muy limitada tanto en cantidad como en su distribución.

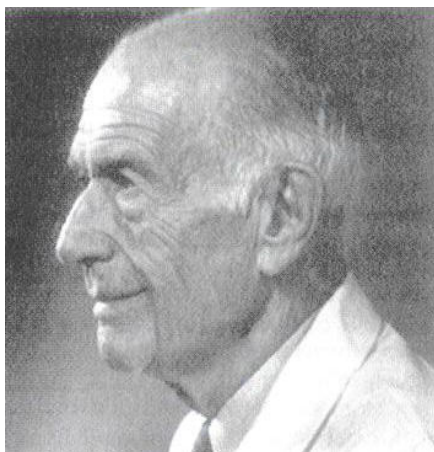


Figura 11. Arthur Vineberg.

En 1954, Murray y cols. comunicaron sus intentos experimentales de incrementar este flujo mediante anastomosis de AMI a arterias coronarias directamente (*Murray et al., 1954*). Poco después, Longmire y cols. fueron capaces de

extraer placas de aterosclerosis de las arterias coronarias sin necesidad de asistencia circulatoria (*Longmire et al., 1958*).

En los años 50 acaecieron múltiples avances en el desarrollo de la circulación extracorpórea, técnica que permitiría la realización de las técnicas de revascularización miocárdica con parada cardiaca. Así, Alfred Blalock, sentó las bases fisiológicas del desarrollo de estas técnicas (*Mueller et al., 1997*). Dennis fue el primero que usó una máquina corazón-pulmón en humanos, aunque los pacientes murieron en la operación (*Dennis et al., 1951*). Sin embargo fue Gibbon en 1953 el que usó la primera máquina de circulación extracorpórea con oxigenador (*Gibbon, 1954*). En 1959 Dubost y cols. se convierten en los primeros en realizar una operación sobre arterias coronarias en humanos empleando circulación extracorpórea al hacer una reconstrucción ostial de la coronaria en un paciente con aortitis sifilítica (*Mueller et al., 1997*).

Senning logró reparar y reconstruir una arteria coronaria enferma en 1961 (*Senning, 1961*). El desarrollo de la cineangiografía coronaria por Sones y Shirey en la *Cleveland Clinic* en la década de los 60 hizo posible la identificación directa de lesiones coronarias estenóticas y oclusivas y sentó las bases de la cirugía de revascularización coronaria directa (*Sones y Shirey, 1962*). En la década de los 70, Effler y cols. comenzaron de forma sistemática a tratar las lesiones coronarias de forma precisa asistidos por la angiografía coronaria (*Effler et al., 1965a*).

La utilización de vasos de diferentes territorios, provenientes del mismo paciente, como hemoductos para la revascularización fueron añadiéndose poco a poco a las mejoras técnicas. Así, en 1960 se realizó por primera ocasión un puente mamario-

coronario, con utilización de la arteria mamaria interna derecha como hemoducto a la coronaria derecha obstruida. Dos años después, Sabiston empleó por primera vez, con poco éxito un conducto venoso de safena a coronaria derecha (*Mueller et al., 1997*). La mamaria interna izquierda, arteria poco afectada por la aterosclerosis, como hemoducto conectado quirúrgicamente a la arteria descendente anterior, fue empleada por primera vez por Kolesov en 1964 (*Kolesov y Potashov, 1965*). Este cirujano ruso, también desarrollo la técnica para el aprovechamiento de ambas arterias mamarias internas en casos de revascularizaciones más extensas (*Kolesov, 1967*).

Favarolo y Effler, en la *Cleveland Clinic*, comenzaron a realizar anastomosis aortocoronarias con injerto de safena en 1967 (*Favarolo, 1969*). Hacia 1971, este grupo había llevado a cabo 741 de estas intervenciones. En 1971, Flemma, Johnson y Lepley describieron la técnica de las anastomosis secuenciales, en las que un mismo injerto era anastomosado a distintas arterias coronarias (*Flemma et al., 1971*). En 1969, en Estados Unidos, ya eran varios los cirujanos cardiotorácicos que realizaban anastomosis de AMI a la arteria descendente anterior asistidos por microscopio quirúrgico (*Green et al., 1968; Edwards et al., 1970*).

Mejoras en los procedimientos de perfusión cardiaca con bomba, técnica de cardioplejia y utilización de vena safena en diferentes y cada vez más arriesgados cuadros clínicos, pusieron de moda esta técnica durante las tres últimas décadas del siglo XX (*Favaloro et al., 1970*).

Las mejoras tecnológicas en el diseño de estabilizadores miocárdicos, el uso como injertos de otros segmentos arteriales como la arteria radial y la arteria gastroepiploica, así como estudios clínicos que informan sobre disminución en desarrollo de accidentes cerebrovasculares, de la estancia hospitalaria y de los costos, sin alteración de la supervivencia a corto y largo plazo, han hecho que la técnica quirúrgica de revascularización sin uso de la bomba de circulación extracorpórea tenga un nuevo auge (*García Fuster et al., 2002; Lamy et al., 2005 y 2006; Kuss et al., 2010*).

4.3.2. Indicaciones

El fundamento del tratamiento quirúrgico de la enfermedad coronaria, al igual que los procedimientos hemodinámicos, se basa en el aumento del aporte de sangre al miocardio. Las indicaciones quirúrgicas de la cardiopatía isquémica se dividen en dos grandes grupos: indicaciones clínicas y anatómicas, las cuales no pueden ser consideradas como independientes (*Eagle et al., 2004; Kohl et al., 2010*).

Indicaciones clínicas:

- La angina inestable que no responde al tratamiento médico, es decir triple terapia a altas dosis (nitroglicerina, antagonistas del calcio y β -bloqueantes).
- Angina crónica estable en grado funcional III-IV que no responde al tratamiento médico antianginoso convencional, e interfiere en la vida normal del paciente de forma importante.

- Angina postinfarto en periodo de aparición inferior a 2-4 semanas, debido al riesgo de reinfarto y/o aparición de las complicaciones mecánicas del infarto de miocardio.
- Isquemia coronaria aguda con inestabilidad hemodinámica después de algún procedimiento hemodinámico fallido.
- Infarto agudo de miocardio en evolución. Esta indicación ha caído en desuso a raíz de la aparición de la fibrinólisis coronaria y la angioplastia de rescate. Anteriormente se consideraba que dentro de las primeras 6 horas del infarto aun existía posibilidad de revascularización quirúrgica.
- Complicaciones mecánicas del infarto agudo de miocardio. Hacen referencia a la insuficiencia mitral postinfarto, comunicación interventricular, rotura cardiaca, y aneurisma de ventrículo izquierdo.

Indicaciones anatómicas:

- Lesión del tronco de la arteria coronaria izquierda igual o mayor al 50% de su calibre.
- Lesión severa proximal (mayor del 50% de su calibre) de la arteria descendente anterior (DA) y arteria circunfleja (CX), que supone un equivalente al tronco de la coronaria izquierda.
- Lesión severa de DA, CX y arteria coronaria derecha (CD) con función ventricular deprimida.

- Lesión severa de DA, CX y CD con función ventricular normal, pero con isquemia inducible mediante pruebas farmacológicas.
- Lesión severa de la arteria DA.
- Anomalías coronarias con riesgo de muerte súbita.
- Lesiones coronarias asociadas a valvulopatías o cirugía de la aorta.
- Lesiones coronarias previas a otra cirugía mayor.

A pesar de que en muchos casos la cirugía es la única opción terapéutica para muchos pacientes, conlleva un riesgo de complicaciones cardiovasculares como infarto miocárdico peri-operatorio, accidente vascular cerebral, complicaciones pulmonares o renales y/o muerte. La aparición de estos eventos ha sido explicada en parte por aspectos técnicos del equipo quirúrgico, la edad del paciente y la presencia de comorbilidades.

Existen diferentes sistemas de valoración de este riesgo quirúrgico, valorado con una frecuencia de un 10 a un 30% (*Ferguson et al., 2002*). La escala EuroSCORE es uno de estos sistemas basados en adjudicación ponderada de puntos por presencia de variables clínicas y de laboratorio, los que al sumarse dan una puntuación final que permite adjudicar una probabilidad de que se presenten complicaciones (Tabla 6). Su uso ha experimentado un auge durante los últimos años, debido a que su aplicación es menos compleja que otras escalas (*PARSONNET, Cleveland Clinic Score, STS Score, etc.*) y que su elaboración y validación se llevó a cabo en hospitales europeos incluyendo algunos españoles. Su sensibilidad para predecir el desarrollo de complicaciones

posquirúrgicas es de 60%. La escala EuroSCORE predice el riesgo quirúrgico en base a una regresión logística de las puntuaciones brutas obtenidas al identificar cada factor de riesgo observado. (*Nashef et al., 1999*).

VARIABLES	PUNTOS
<u><i>Variables extracardíacas</i></u>	
Edad (por cada período de 5 años, total o parcial por, encima de 60)	1
Sexo femenino	1
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	1
Arteriopatía extracardíaca	2
Disfunción neurológica	2
Cirugía cardíaca previa	3
Creatinina sérica preoperatoria >200 µmol/l (>2.25 mg/dl)	2
Endocarditis activa	3
Estado preoperatorio crítico	3
<u><i>Variables cardíacas</i></u>	
Angina inestable con nitratos endovenoso	2
Fracción de eyección 30-50%	1
< 30%	3
Infarto reciente (menos de 90 días)	2
Presión arterial sistólica pulmonar > 60 mmHg	2
<u><i>Variables operatorias</i></u>	
Emergencia	2
Cualquier operación distinta de cirugía coronaria aislada	2
Cirugía de aorta torácica	3
Rotura septal postinfarto	4

$$\text{Mortalidad predicha} = e^{(\beta_0 + \beta_i x_i)} / (1 + e^{(\beta_0 + \beta_i x_i)})$$

Tabla 6. Escala de riesgo EuroSCORE. La suma total de puntos permite clasificar en tres grupos de riesgo de desarrollo de complicaciones postoperatorias: Bajo riesgo, puntuación menor de 2 (riesgo del 1%); medio, de 3 a 5 (riesgo de 3%); y alto, mayor a 6 (riesgo de 10 – 11%). *Ferguson, 2002*

5. Investigación traslacional.

La separación tradicional de la investigación médica en ciencia básica y clínica, produce dificultades en la interpretación de un mismo fenómeno desde dos puntos de vista diferenciados, aumenta los costes y fallos al aplicar hallazgos realizados en modelos animales al ser humano.

Un nuevo y creciente modelo de aplicación del método científico permite unificar estas corrientes. Es la denominada “investigación traslacional”, y tiene como objetivo principal que la información obtenida en estudios animales, mediante la aplicación de técnicas aplicadas y validadas en estos modelos, sea traducida en datos de relevancia clínica y viceversa, proporcionando así una base conceptual para el desarrollo de mejores fármacos (*Hörig y Pullman, 2004*). Se considera que este enfoque, inicialmente implementado en oncología para el estudio de efectos y dosis de quimioterapia y radioterapia (*Dische y Saunders, 2001*), y actualmente extendido a todas las ramas de la medicina, permite, “desde la cama del paciente a la mesa del laboratorio y viceversa”, acortar caminos, optimizar recursos y abaratar costes.

El presente estudio, se realizó con el objeto de contestar, bajo una perspectiva traslacional, las siguientes preguntas: ¿Cómo influyen los distintos factores de riesgo cardiovascular en el estrés oxidativo en la aterosclerosis? ¿Puede relacionarse el perfil oxidativo de un paciente con su riesgo cardiovascular? ¿Puede predecir el perfil oxidativo de un paciente sometido a cirugía coronaria su riesgo quirúrgico?

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis.

- I. En base a la revisión bibliográfica realizada al respecto de este trabajo, nos planteamos que existe un deterioro de la actividad oxirreductora del organismo como parte de la respuesta fisiológica del mismo al estrés y la reperfusión en el contexto de la cirugía coronaria. Por tanto, nos planteamos si el estado oxidativo empeora en respuesta a la cirugía de revascularización miocárdica.
- II. A tenor de múltiples estudios realizados en modelos animales, y excepcionalmente en humanos, se ha comprobado la relación entre estrés oxidativo y algunos factores de riesgo cardiovascular. En este estudio nos cuestionamos si existe una relación entre los factores de riesgo cardiovascular clásicos (hipertensión arterial, diabetes mellitus, sexo, edad, dislipemia, obesidad,..) y estrés oxidativo en una muestra de pacientes con enfermedad coronaria sometidos a una cirugía de revascularización miocárdica.
- III. Existen múltiples escalas que predicen el riesgo cardiovascular (QRISK, Framingham, etc...); y otras que predicen el riesgo postoperatorio de una cirugía cardíaca (EuroSCORE, STS, Parsonnet,...). Nos planteamos la posibilidad de que los parámetros de estrés oxidativo que investigaremos se relacionaran con las puntuaciones de la escala EuroSCORE y Framingham.

Objetivos.

- I. Comprobar las alteraciones del estrés oxidativo debidas a una cirugía de revascularización miocárdica en una cohorte de pacientes con enfermedad coronaria.
- II. Estudiar las posibles relaciones entre distintos factores de riesgo cardiovascular y distintos parámetros de estrés oxidativo.
- III. Comprobar la relación entre estrés oxidativo y la escala Framingham de riesgo cardiovascular y EuroSCORE de riesgo quirúrgico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes.

1.1. Selección de pacientes.

Los pacientes de estudio fueron seleccionados de la población de pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica en un único centro (Hospital Clínico San Carlos, Consejería de Salud de la Comunidad Autónoma de Madrid) y por un único servicio (Servicio de Cirugía Cardíaca, Instituto Cardiovascular). Los pacientes intervenidos en dicho centro tenían procedencia de municipios de la Comunidad de Madrid y provincias de las comunidades de Castilla La Mancha y Castilla y León (Segovia, León, Ávila, Toledo, Cuenca. y Albacete).

El periodo de inclusión de los pacientes en el estudio se prolongó desde Enero de 2004 hasta mayo de 2009. Los pacientes fueron seleccionados de forma consecutiva.

Se entregó a todos los pacientes del estudio un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico San Carlos. Previamente a su inclusión en el estudio todos los pacientes firmaron dicho consentimiento.

Todos los pacientes fueron sometidos a un minucioso interrogatorio clínico para determinar su historia cardiovascular y se estimó en todos los casos su riesgo cardiovascular (escala Framingham /ATP III) y riesgo quirúrgico (EuroSCORE numérico y logístico).

1.1.1. Criterios de inclusión.

Se incluyeron de forma consecutiva a todos los pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica (CRM) en dicho centro diagnosticados de enfermedad coronaria aterosclerótica mediante angiografía diagnóstica.

1.1.2. Criterios de exclusión.

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes con cualquier situación clínica que pudiese enmascarar el estado de estrés oxidativo o inflamatorio. A saber:

- Pacientes mayores de 80 años de edad.
- Pacientes diagnosticados de enfermedad neoplásica maligna.
- Pacientes con enfermedades autoinmunes.
- Pacientes con enfermedad coronaria aterosclerótica intervenidos de forma emergente o urgente por angina inestable o infarto agudo miocárdico en evolución.
- Pacientes con cualquier patología cardíaca (patología valvular o de aorta) además de la coronaria que obligase al uso de circulación extracorpórea durante la intervención.
- Pacientes con enfermedad coronaria que fueron intervenidos bajo circulación extracorpórea.
- Pacientes fallecidos antes de la toma de todas las muestras sanguíneas necesarias para el estudio o que sufrieran un IAM o un ACV entre el momento de la cirugía y la extracción de las muestras postoperatorias.

1.2. Técnica quirúrgica.

Los pacientes son sometidos a cirugía en quirófano.

Se les canaliza una vía periférica, una vía central y una arteria radial para la monitorización de la presión arterial y toma de muestras para gasometría arterial sanguínea durante la intervención.

Los pacientes son sometidos a anestesia general combinada con sedación total y relajación muscular. En la inducción y mantenimiento anestésico del paciente se emplean los siguientes fármacos:

- Propofol (10-100 µg/kg/min intravenoso (IV))
- Etomidato (5-10 µg/kg/min)
- Rocuronio (0.6 – 1.2 mg/kg IV) o Isatracurio (1- 1.5mg/Kg IV)
- Succinilcolina (1 mg/ Kg IV).
- Remifentanilo (0.05- 2 µg/Kg/min IV).
- Sevoflurano inhalado con una mezcla al 2% con oxígeno al 100%..

Todos los pacientes son intubados orotraquealmente y se les asiste con ventilación mecánica.

Los enfermos son colocados en la mesa de quirófano en posición de decúbito supino. Se prepara el campo quirúrgico mediante lavado con alcohol 60% y povidona yodada posteriormente.

El acto quirúrgico comienza con una esternotomía media longitudinal. A continuación se disecciona con bisturí eléctrico los injertos vasculares a utilizar en la

revascularización coronaria: arteria mamaria interna izquierda y/ o derecha, arteria radial y/o vena safena.

Una vez extraídos los injertos, se hepariniza al paciente con heparina sódica intravenosa (10 UI/g) a dosis de 1-1.5 g/kg de peso y se controla el rango de anticoagulación mediante ACT (*activated clotting time*) de 300 a 350 s.

Se identifican las arterias coronarias a revascularizar.

Se inmoviliza la región miocárdica donde se encuentra el vaso coronario a revascularizar mediante el dispositivo Cor-Vasc[®] (CORONEO ©, Toronto, Canadá). Con una hoja de bisturí de 5 mm se diseca el epicardio de la arteria. Se ocluye proximal y distalmente el segmento arterial a revascularizar mediante cintas de silastic de 1/0. Se abre la arteria coronaria mediante incisión longitudinal con bisturí de 5 mm.

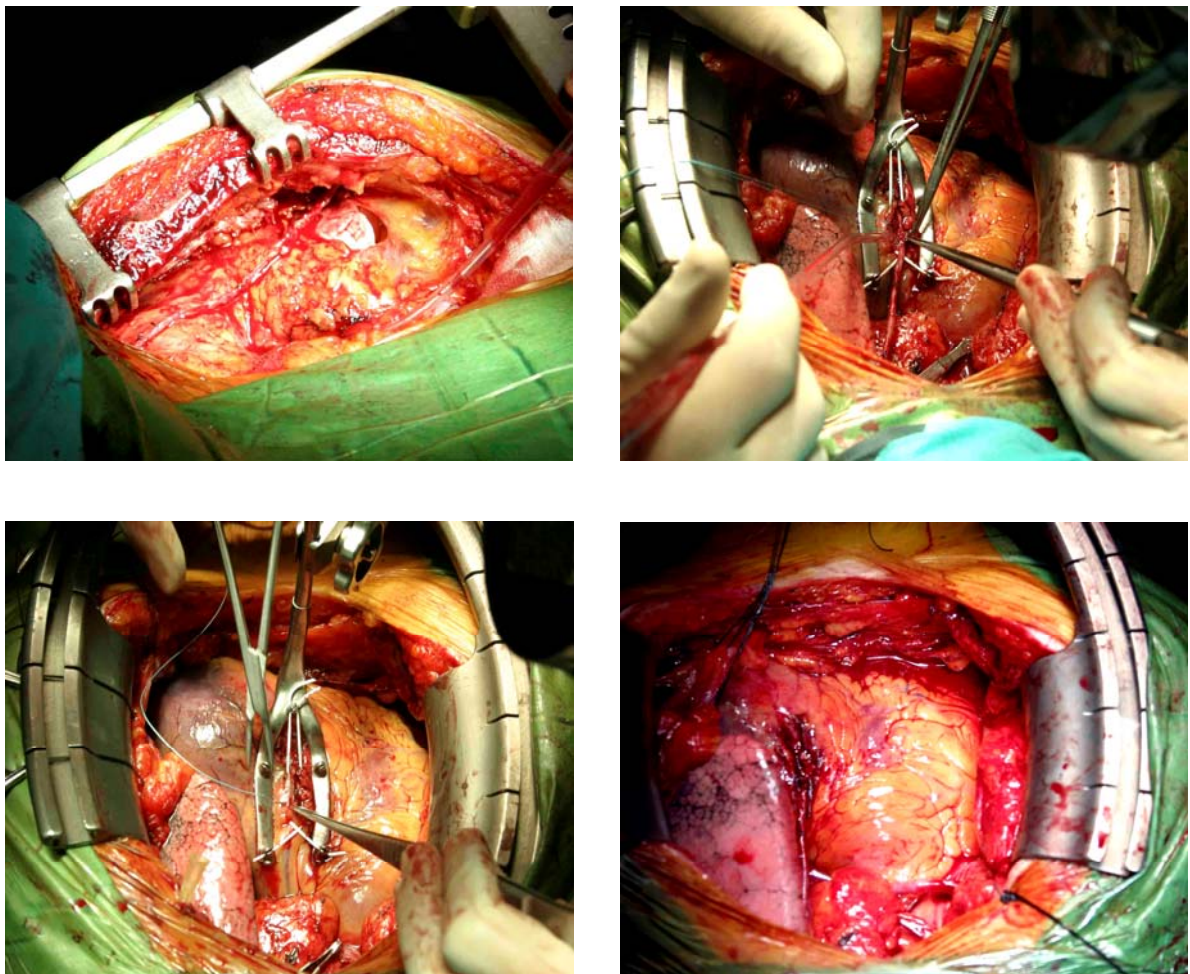
A continuación se realiza la anastomosis con sutura continua de polipropileno 7/0. (Figuras 12.1 a 12.4).

Tras finalizar las anastomosis distales se realizan las anastomosis proximales a la arteria aorta. Para ello, se pinza lateralmente la aorta, se realiza una incisión transversal en la aorta con una hoja de bisturí de 11 mm y se anastomosa el extremo proximal del injerto con sutura continua de polipropileno de 6/0.

Se comprueba la permeabilidad de los injertos mediante flujometría ecográfica con el dispositivo Butterfly Flowmeter[®] (Medtronic ©, Minneapolis, Estados Unidos de América).

Una vez verificada la permeabilidad de los injertos se inhibe el efecto de la heparina mediante protamina a razón de 1 mg de protamina/ 1mg de heparina.

Posteriormente, se realiza hemostasia quirúrgica, se reaproxima el esternón con sutura metálica, y el tejido celular subcutáneo y la piel con sutura reabsorbible.



Figuras 12.1, 12.2, 12.3, 12.4. (Arriba abajo e izquierda a derecha). Injerto de arteria mamaria interna izquierda a arteria coronaria descendente anterior sin circulación extracorpórea. 12.1: Disección de arteria mamaria interna. 12.2: Disección de arteria descendente anterior. 12.3 Anastomosis de arteria mamaria a descendente anterior. 12.4: Anastomosis completada.

1.3. Extracción de muestras.

Se toman las siguientes muestras sanguíneas:

- Estudio basal prequirúrgico. Se realiza 48 horas antes de la intervención.

Determinación en ayunas de:

- Bioquímica: Glucosa sanguínea (g/dL), Hemoglobina glicosilada (%), colesterol total (mg/dL), colesterol HDL (mg/dL), colesterol LDL (mg/dL), ionograma completo (sodio, potasio, cloro, hierro, calcio), proteínas totales (g/dL), albúmina (g/dL).
 - Hematimetría: Hemograma y recuento leucocitario.
- Determinación de parámetros de estrés oxidativo.
 - Prequirúrgico: 10.8 mL (4 tubos con citrato sódico al 3.2% Azul Hemogard TM (Vacutainer ©, Estados Unidos) a las 08:00 del día de la intervención con el paciente en ayunas.
 - Postquirúrgico: 10.8 mL (4 tubos con citrato sódico al 3.2% Azul Hemogard TM (Vacutainer ©, Estados Unidos) a las 08:00 del día siguiente a la intervención con el paciente en ayunas.

Las muestras se conservan a temperatura ambiente unos 30 minutos hasta su procesamiento. Tras su centrifugación, son congeladas y enviadas al Laboratorio del Departamento de Farmacología Humana de la Facultad de Medicina de Málaga. Universidad de Málaga.

2. Descripción de las técnicas analíticas: estrés oxidativo y estado inflamatorio

El estado oxidativo se evaluó en dos vertientes distintas:

- ***Daño oxidativo.*** Determinación de la capacidad de peroxidación lipídica de las membranas celulares, a través de la cuantificación de productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), cuyo principal representante es el malondialdehído (MDA). Otras determinaciones: nitritos en sangre periférica.
- ***Defensa antioxidante.***
 - Cuantificación del contenido celular de glutatión total, oxidado y reducido (GST, GSSG y GSH respectivamente).
 - Cuantificación de superóxido dismutasa rica en manganeso (SOD-Mn) mitocondrial.

2.1. Determinación de los productos de reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS)

2.1.1 *Finalidad y fundamento*

La capacidad de peroxidación lipídica de las membranas celulares se determina a través de la cuantificación de los productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) cuyo principal representante es el malondialdehído (MDA). El

malondialdehído (MDA) es un producto derivado del metabolismo del ácido araquidónico, que se produce por hidrólisis del endoperóxido cíclico PGH₂ junto al ácido 12-hidroxihexadecatienoico.

La determinación de este metabolito del ácido araquidónico nos indica de modo indirecto los niveles de peroxidación alcanzados por un tejido (*Buege y Aust, 1978*) y, aunque no es un metabolito específico del catabolismo peroxidativo, sí es un buen indicador del funcionalismo de esta vía oxidativa. Presenta también la ventaja de que puede colorearse al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico; lo que nos permite de forma fácil cuantificar sus niveles en cualquier muestra determinando simplemente su absorbancia espectrofotométrica. (*Bird y Draper, 1984*).

2.1.2 Método

Para la determinación de TBARS en tejidos, seguimos la técnica descrita previamente por Bellido y De La Cruz (*Bellido et al., 1991; De la Cruz et al., 1992*).

1. Se procedió a la dilución de las alícuotas de lisado de hematíes mediante agitación en el tampón de incubación descrito para la obtención de la fracción P2 con Tris-20 mM en proporción 1:2 (peso/volumen).
2. Una vez obtenida la dilución, se repartieron las muestras en alícuotas en tubos de cristal y se acomodaron en una gradilla. Éstas se mantuvieron inmersas en hielo triturado y agua durante todo el tiempo de preparación.
3. En los casos de incubación con algún compuesto (experimentos *in vitro*), se hizo en un volumen de 50 µL. A las muestras problema se les añadió los inductores de la

peroxidación lipídica, sulfato ferroso y ácido ascórbico, ambos en un volumen de 50 μ L también, mientras que al control se le añadió el mismo volumen pero de agua. El volumen final de la muestra fue en todos los casos el mismo.

La incubación del compuesto se hizo durante 30 minutos en un baño a 37 °C. En los casos en que se indujo a la peroxidación lipídica, las sustancias se añadieron a continuación en las mismas condiciones pero durante un periodo de tiempo de 45 min. Durante todo el proceso, los tubos se taparon y cubrieron con papel de aluminio, para evitar de este modo, su exposición a la luz y en agitación continua a una velocidad de 100 bats/min.

4. Tras la incubación, las muestras fueron extraídas del baño y destapadas. Se añadió a las muestras problema y sus controles un volumen de 500 μ L de una solución de ácido tiobarbitúrico al 0.5% en ácido tricloroacético al 20%, para colorear los TBARS formados en el primer caso y para precipitar las proteínas y frenar de esta forma la reacción en el segundo.

5. A continuación todas las muestras, problemas y controles, fueron introducidas en un baño termostatzado a 100°C durante 15 minutos.

6. Finalizado este tiempo fueron pasadas a tubos de plástico siliconados y centrifugadas a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C.

7. Una vez obtenido el sobrenadante, se procedió a su medición mediante un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 532 nm en el espectro de luz visible.

2.1.3. Valoración de los resultados.

El valor de la absorbancia resultante, fue transformado en nmoles de TBARS mediante su comparación con una curva de calibración estándar de TBARS realizada previamente con malondialdehído-bis-dietilacetal en un rango de concentraciones de 0 a 100 nmol/L y siguiendo la metodología anteriormente descrita para la determinación de TBARS en los tejidos, pero utilizando como sustituto del tejido concentraciones crecientes de TBARS.

Los datos de la curva estándar de TBARS se analizaron mediante un programa de regresión no lineal y sobre estos datos se compararon las absorbancias de las muestras, obteniéndose la cantidad de TBARS de las mismas en nmol/mL.

Los valores de TBARS en nmoles producidos por las muestras, se relacionaron posteriormente con los mg de proteínas existentes en ella, expresando el índice de productos lipídicos reaccionantes con el ácido tiobarbitúrico en último término en nmoles de MDA/mg de proteínas.

2.2. Determinación de los niveles de glutatión.

La determinación de los niveles de glutatión se realizó mediante espectrofluorimetría:

1. Para el desarrollo de esta experiencia se tomaron 250 μ L de lisado de hematíes, que se pusieron en un homogenizador al que se adicionó un volumen fijo de tampón fosfato sódico 0.1 M (pH 8.0) de 1,88 mL.

2. Se realizó la homogeneización manual y una vez obtenida una mezcla homogénea, se añadió 0,5 mL de ácido fosfórico al 25%.
3. Esta solución contenida en el homogenizador fue vertida en un tubo siliconado para proceder a su centrifugación, la cual se realizó a 15000 x g durante 33 minutos a una temperatura de 4°C.
4. Durante la espera de la centrifugación, se elaboró una curva patrón de GSH, a partir de una solución 1 mol/L (3.073 mg de GSH en 10 mL de tampón fosfato sódico), realizando sucesivas diluciones: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, etc. Todo ello se mantuvo en frío utilizando hielo triturado y agua.
5. Una vez finalizada la centrifugación, se recogió el sobrenadante mediante pipeta pasteur.
6. Para la determinación de GSSG, se separaron 200µL de sobrenadante de cada muestra y se añadieron 8 µL de 4-vinil-piridina, con el objeto de bloquear todo paso de glutatión reducido a oxidado. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. A continuación se pusieron en tubos de plástico y según el orden que se indica, los siguientes componentes: 0,9 mL de tampón fosfato sódico a todos los tubos, 50µL de las muestras (ya sean de GST o de GSSG) o de la correspondiente concentración estándar y por último a todos los tubos se les adicionó 50µ L de o-phtaldehído (sustancia fluorescente).
8. Se agitaron y se incubaron durante 15 minutos.

9. Pasado este tiempo se procedió a la lectura en el espectrofluorímetro, utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm dando lugar a los valores de la curva patrón y el glutatión total (GST).

2.2.1. Valoración de los resultados

Los datos de los registros gráficos (cm) correspondientes a las concentraciones de la curva estándar, se introdujeron en un programa gráfico que calculó su regresión.

Una vez obtenido el dato de glutatión en nmol/100 µL, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y el peso del tejido añadido, se aplicó la siguiente expresión matemática (para una dilución 1:5):

$$\text{Glutathione} = \frac{\left(\frac{\text{Glutathione (nmol)}}{100 \mu\text{L}} \right) \times 273.5}{\text{mg de tejido}}$$

Expresándose los resultados, de esta forma, en µmol/g de tejido.

Esta valoración se realizó para glutatión total (GST) y glutatión oxidado (GSSG), calculándose el glutatión reducido (GSH) mediante la diferencia:

$$\text{GSH} = \text{GST} - \text{GSSG}$$

Asimismo, se calculó el porcentaje de glutatión que se encontraba en forma oxidada/reducida, según la siguiente expresión:

$$\text{GSSG (\%)} = \frac{\text{GSSG} \times 100}{\text{GSH} + \text{GSSG}}$$

$$\text{GSH (\%)} = 100 - \text{GSSG (\%)}$$

2.3. Determinación de la actividad enzimática de la SOD mitocondrial (Mn-SOD).

2.3.1. Finalidad y Fundamentos:

La SOD es una metaloenzima que cataliza la disminución de parte del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Por tanto tiene un papel fundamental en los mecanismos de defensa antioxidantes celulares:



Existen tres tipos de SOD que han sido diferenciadas según su contenido en metal: cobre/zinc, manganeso y hierro. La SOD se encuentra ampliamente distribuida por el organismo, y en el ser humano se encuentra en tres formas distintas: citosólica, extracelular y mitocondrial (Mn-SOD, rica en manganeso). (*Sandstrom et al., 1994*)

La cantidad de SOD presente en los espacios intra y extracelulares es fundamental para la prevención de enfermedades vinculadas al estrés oxidativo, puesto que mantiene bajos los niveles de anión superóxido. En situaciones con una actividad disminuida de la SOD o exceso de NO, el NO compite con la SOD por el superóxido favoreciendo la producción de peroxinitritos, con un papel pernicioso en procesos inflamatorios como la aterosclerosis. (*Mattiazz et al., 2002*)

El kit para la determinación de SOD empleado (Cayman's SOD Assay Kit®, Ann Arbor®), emplea una sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxi generados por la xantina oxidasa e hipoxantina (ver figura 13). Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una disminución del 50% del radical superóxido.

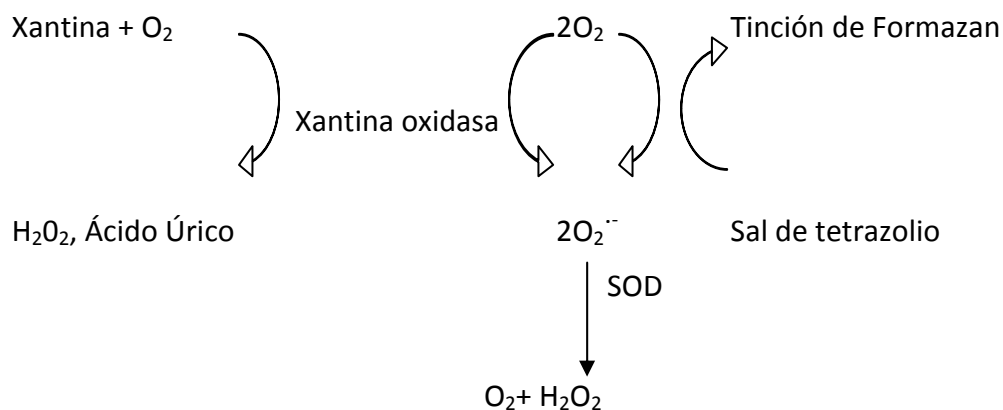


Figura 13. Esquema del test de SOD.

2.4.2. Método.

Se determinó la actividad de la SOD según el método propuesto por Marklund (Marklund, 1980).

1. Se obtiene lisado celular mediante centrifugación a 2000 rpm 10 minutos a 4°C.
2. El pellet celular se homogeniza en tampón frío con 20mM de tampón HEPES, pH7.2, 1mM EGTA, 210 MM manitol y 70mM de sacarosa.
3. Se centrifuga a 1500 rpm 5 minutos a 4°C.
4. Se retira el sobrenadante para estudio y se conserva a -80°C si no se va a emplear en el mismo día (la muestra se mantendrá estable durante al menos 1 mes).
4. Se añade 1-3 mM de potasio cianídico para inhibir las otras formas de SOD y detectar exclusivamente la Mn-SOD.

5. Se obtienen muestras sin xantina oxidasa para generar un patrón de referencia de absorbancia. La absorbancia de estas muestras será restada de la absorbancia de las muestras con xantina oxidasa, para corregir la absorbancia no debida a la SOD.

6. Se diluye 20 microlitros de SOD en 1.98 mL de tampón. Sobre esta dilución, se preparan las muestras estándares con las siguientes 7 diluciones de SOD y muestra tampón (Tabla 6).

Tubo	SOD (microlitros)	Tampón (microlitros)	Actividad SOD final (U/mL)
A	0	1000	0
B	20	980	0.025
C	40	960	0.05
D	80	920	0.1
E	120	880	0.15
F	160	840	0.2
G	200	800	0.25

Tabla 6. Estándares de SOD.

7. Preparación de los pocillos con estándares de SOD: se añaden 200 microlitros del detector de radicales disuelto y 10 microlitros de los distintos estándares en 7 pocillos distintos.

8. Pocillos de la muestra: Se añaden 200 microlitros del detector radical disuelto y 10 microlitros de la muestra a estudio a cada uno de los pocillos

9. Se inicia la reacción añadiendo 20 microlitros de xantina oxidasa (provista en el kit) a todos los pocillos salvo al primero que nos servirá para obtener el patrón.

10. Se agita cuidadosamente la placa con todos los pocillos para favorecer la mezcla y se incuba a 20 minutos a temperatura ambiente. Se lee la absorbancia a 440-460 nm.

2.4.3. Análisis de los resultados.

Los datos de los registros gráficos, en centímetros, correspondientes a las concentraciones de la curva estándar, se introdujeron en un programa gráfico que calculó la regresión lineal de los mismos, así como las actividades enzimáticas de la SOD en U/ml para cada muestra.

3. Material.

3.1. Instrumental y Aparatos.

- Agitador de tubos de ensayo. Mod. Reax 2000®. Heidolph Comecta©. Alemania.
- Balanza de precisión modelo AJ-100. Mettler instruments AG©, Suiza.
- Baño de bloque metálico en seco para tubos “Multiplaces” con temperatura regulable de 10-200°C. Selecta©. España.
- Baño termostatado con temperatura variable de 0°C a 100°C. Mod. MT/2®. MGW Lauda©. Alemania.
- Baño termostatado Unitronic con temperatura variable de 0°C a 100°C, con sistema regulable de agitación. Selecta©. España.
- Cámara de congelación a -80°C. Eurocold©.
- Cámara frigorífica a 4 °C. Eurocold©.
- Carbógeno (O₂ + CO₂). Alphagaz Mix 5% CO₂ /O₂ Presión 150 bar. Volumen total 8.1 m³. Air Liquide©. España.
- Centrífuga refrigerada. Kubota Modelo 5800. Pacisa©. Madrid.
- Centrífuga eppendorf. Mod. 5415 D.
- Destiladora de agua modelo Milli-QRG. Millipore©, Francia.
- Espectrofotómetro con control de temperatura TSU. Modelo UV-1603. Shimadzu©.
- Espectrofotómetro Fluostar galaxi. BMG Labtechnologies©.

- Granatario de precisión Mod. C-300-S. Cobos©. España.
- Homogeneizador con vasos intercambiables de 2, 5, 15, 30 y 60 cc. Mod. 853202. Braun melsulgen S.A. © Alemania.
- Imanes de agitación.
- Material quirúrgico: diversas pinzas y tijeras, disector, bisturí, etc.
- Microcubetas de plástico para espectrofotometría. Mod. 1938. Kartell©. Italia.
- Micropipetas de volumen variable: 2-20 μl , 20-200 μl , 200-1000 μl . Modelo Extend©. Menarini, España.
- Nitrógeno (N_2). Alphagaz N_2 . Presión 200 bar. Volumen total 9.4 m^3 . Air Liquide©. España.
- Peachímetro digital Crison. Mod. micropH 2000. Crison©. España.
- Pipeta dosificadora multiuso Multipette de volumen variable desde 10 μL a 5 mL. Mod. Multipette. Eppendorf Gerätebau©. Alemania.
- Pipetas de plástico pasteur desechables. Laboplast©, España.
- Placas de agitación con tacómetro graduable de 60 a 1600 r.p.m. Mod. Agimatic-S. Selecta©. España.
- Polarstar Galaxy. Sistemas de medida combinado para absorbancia y fluorescencia. Biogen científica©. Madrid. España.
- Puntas de pipeta desechables; 1-200 μl y de 100-1000 μl . Daslab©. España.
- Rejillas metálicas para sujeción de tubos.
- Tubos siliconados de 5 ml. Eurotubo, España.
- Tubos cónicos de plástico de 1 ml. Eppendorf©, Alemania.
- Tubos de cristal. Mod. 1636/30M de 16 x 160. Pyrex©. España.

- Tubos de plástico para ultracentrifugación. Part Number 344088. Beckman©.
- Ultracentrífuga Modelo L80. Beckman Instrument España SA©. Madrid.
- Vasos de precipitado de 500 ml de vidrio.

3.2. Reactivos.

3.2.1. Reactivos de la técnica para la determinación de proteínas según el método de Bradford.

Su composición se detalla a continuación:

- Brilliant Blue G: Pm 854.0. Lote 32H7706. SIGMA Chemical Co©.USA. La cantidad que se utiliza es 0.1g .
- Alcohol etílico (CH₃-CH₂OH) al 96% (P/V). Densidad 0.816g/cc. Probus©. España. La cantidad utilizada es 50 mL.
- Acido ortofosfórico (H₃PO₄): Pm 98.00. Riqueza 85%. Lote 28070. Montplet & Esteban©. La cantidad que se utiliza es 100 mL.

Todo ello se pone en un matraz y se completa hasta 1000 mL de agua destilada.

3.2.2. Reactivos para la determinación del glutatión total por espectrofluorometría.

- Tampón de homogeneización fosfato sódico 0.1 M, conteniendo EDTA (5mM). pH 8.0. La composición del tampón es la siguiente:
 - Sodio Fosfato bisódico (Na₂PO₄H): Forma anhidra. Pm 141.98. Riqueza 99%.

Probus, S.A©. España. 14.19 g/L.

- Fosfato Monosódico (NaPO_4H_2): Pm 156.03. PR₀BU₅, S.A©. España. 15.60 g/L.
- EDTA: Pm 292.2. Lote 55F-0045. Forma anhidra. Riqueza 99%. Sigma Chemical Co©. USA. 146 mg/100 mL.
- REACTIVOS:
 - Acido Ortofosfórico (H_3PO_4): Pm 98.00. Riqueza 85% por lo que debemos diluir para conseguir que la riqueza sea del 25%. Lote 28070. Montplet y Esteban S.A. © España. 1 mL.
 - 4-Vinilpiridina. Lote 73H1066. Sigma Chemical Co. © USA.
 - O-Phtaldehido (OPA): P_m 134.1. L_{ote} 93H7750. Riqueza 99%. Sigma Chemical Co©. USA. 6 mg en 6 mL de metanol.

3.2.3. Componentes de la solución de incubación para peroxidación lipídica.

- Bicarbonato sódico (NaHCO_3): Pm 84.01. Riqueza 99.5%. Lote K30929. Merck©. Alemania.
- Cloruro sódico (NaCl): Pm 58.44. Lote 126 F-02731. Sigma. Chemical Co©. USA.
- Cloruro cálcico (CaCl_2): Pm 110.99. Riqueza 95%. Panreac©. España.
- Cloruro potásico (KCl): Pm 58.45. Probus©. España.
- D-glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$): Pm 180.16. Forma anhidra. Lote 5231339. Merck©. Alemania.
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4): Pm 136.09. Lote 59676. Probus©. España.

- Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): Pm 246.48. Riqueza 99.5%. Lote 5272745.

Alemania

- La composición molar de la solución de incubación fue: ClNa 0.1 M, ClK 5×10^{-4} M, Cl_2Ca 3.1×10^{-3} M, MgSO_4 1×10^{-3} M, Glucosa 4.9×10^{-3} M, NaCO_3H 2.4×10^{-2} M, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 5.5×10^{-4} M, en agua bidestilada y desionizada.

3.2.4. Agentes inductores de la peroxidación lipídica

- Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): Forma heptahidratada con un 98% de riqueza. Pm 278.0. Lote 115 F-0368. Sigma Chemical Co©. USA.
- Ácido l-ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$): Pm 176.13. Lote 16 F-06401. Sigma Chemical Co©. USA.

3.2.5. Reactivos para la reacción de malondialdehído

- Tampón de homogenización Ringer, conteniendo ClNa , ClK , Cl_2Ca , SO_4Mg , Glucosa, CO_3HNa y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$
- Ácido tiobarbitúrico (4,6-hidroxi-2-tiopiridina): Forma anhidra. Pm 144.1. Lote 46F-0110. SIGMA Chemical Co©. USA.
- Ácido tricloroacético: En solución al 20% (P/V). Montplet y Esteban S.A. © España.
- Malonaldehído-bis-(dietilacetal): Pm 220.31. Densidad 0.919. Riqueza 98%. Lote 04318 CT. Aldrich Chemical Co. © USA.

3.2.6. Reactivos para la determinación de la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD). (Cayman Chemical Company, © Ann Arbor. USA.)

- Tampón.
 - 50 mM Tris-HCl.
 - 0.1 mM ácido dietilentriaminopentaacético.
 - 0.1 mM hipoxantina.
 - Agua destilada.
- Detector de radicales (contiene sal de tetrazolio) (50 microlitros de la solución de esta solución provista en el kit se mezclan con 19.95 mL de tampón).
- SOD bovina standard.
- Xantina oxidasa.

3.3. Componentes de las soluciones de incubación empleadas en otros.

- Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$): Pm 342.30. Lote 176820. Probus©. España.
- TRIS (Hidroximetil-aminometano): Pm 121.1. Riqueza 99.5%. Lote 106F-5629.

Sigma Chemical Co. © USA.

4. Método estadístico.

Las variables recogidas en el estudio son:

- Variables sociodemográficas, médicas y analíticas preoperatorias:

Variables	Expresión
Edad (años)	Media (IC 95% o SD)
Sexo (femenino)	n (%)
Diabetes mellitus (criterio ADA)	n (%)
Enfermedad aterosclerótica vascular no coronariana	n (%)
Hipertensión (PAS \geq 140 mmHg, PAD \geq 90)	n (%)
Obesidad (IMC \geq 30 kg/m ²)	n (%)
Dislipemia	n (%)
Infarto miocárdico 90 días previos a cirugía	n (%)
Número de vasos coronarios lesionados	n (%)
Tabaquismo	n (%)
Consumo de antiagregantes (AAS/Clopidogrel)	n (%)
Consumo de hipolipemiantes	n (%)
Consumo de antihipertensivos	n (%)
EuroSCORE logístico	Media (IC 95% o SD)
EuroSCORE numérico	Media (IC 95% o SD)
Framingham /ATP III (estándar)	Media (IC 95% o SD)
Colesterol HDL (mg/dL)	Media (IC 95% o SD)
Colesterol LDL (mg/dL)	Media (IC 95% o SD)
Colesterol total (mg/dL)	Media (IC 95% o SD)
Glucemia (g/dL)	Media (IC 95% o SD)

Hemoglobina glicosilada (%)	Media (IC 95% o SD)
Nitritos en sangre periférica (μmol/g)	Media (IC 95% o SD)
Peroxinitritos (μmol/g)	Media (IC 95% o SD)
Porcentaje de glutatión reducido (%)	Media (IC95% o SD)
Glutatión reducido (μmol/g)	Media (IC 95% o SD)
Glutatión oxidado (μmol/g)	Media (IC 95% o SD)
Porcentaje de glutatión reducido (%)	Media (IC 95% o SD)
SOD Mn (U/mL)	Media (IC 95% o SD)
MDA plasmático (nmol/mg)	Media (IC 95% o SD)
MDA hematíes (nmol/mg)	Media (IC 95% o SD)

- Variables postoperatorias:

Variables	Expresión
Nitritos en sangre periférica (μmol/g)	Media (IC 95% o SD)
Peroxinitritos (μmol/g)	Media (IC 95% o SD)
Glutatión reducido (μmol/g)	Media (IC 95% o SD)
Glutatión total (μmol/g)	Media (IC 95% o SD)
Glutatión oxidado (μmol/g)	Media (IC 95% o SD)
Porcentaje de glutatión reducido (%)	Media (IC 95% o SD)
SOD Mn (U/mL)	Media (IC 95% o SD)
MDA plasmático (nmol /mg)	Media (IC 95% o SD)
MDA en hematíes (nmol/mg)	Media (IC 95% o SD)

La valoración estadística de dichos resultados se realizó mediante la utilización del programa para ordenador personal SPSS (Social Program for Statistical Sciences) para Windows XP, versión 16.0 (SPSS Inc., 2006), licenciado para su uso por el Servicio Central del Hospital Clínico San Carlos.

Una vez confirmada la homogeneidad de las varianzas, se realizó una comparación de medias mediante el test ANOVA. Igualmente, se empleó el test de t de Student o U de Mann Whitney para muestras independientes o relacionadas, según el caso. Se empleó el test de Shapiro Wilks para el estudio de la normalidad de las variables cuantitativas y de los residuales de regresión múltiple. Se realizaron test de regresión lineal para la comparación de variables cuantitativas. Aquellas variables relacionadas con la variable efecto con $p < 0.1$ fueron seleccionadas para la construcción de modelos lineales descriptivos multivariantes. Se aplicaron posteriormente tests de regresión lineal múltiple para la construcción de modelos descriptivos de las escalas EuroSCORE y Framingham y para cada uno de los parámetros de estrés oxidativo. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con $p < 0.05$. Se comprobó la capacidad descriptiva de los modelos con tests de R^2 y estudios de normalidad de residuales.

RESULTADOS

1. Descripción de la muestra.

1.1. Características demográficas y clínicas preoperatorias.

Se incluyeron en el estudio 119 pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica. Las características demográficas, clínicas y antropométricas basales de la muestra se resumen en la Tabla 7.

Se observó un predominio de varones en la muestra (tan sólo un 16.8% de mujeres); así como una gran prevalencia de factores de riesgo cardiovascular como hipertensión arterial (74.8%), dislipemia (72.3%) o diabetes mellitus (41.2%). Así mismo, se apreció un predominio de la enfermedad de tres vasos coronarios (60.5%). Aproximadamente un tercio de la muestra (30.3%) padecía enfermedad severa del tronco coronario izquierdo. Como era de esperar, la mayoría de los pacientes era tratada con fármacos antiagregantes plaquetarios en el momento de la intervención (72.3%). El 6.7% y el 24.4% de la muestra consumía nitratos intravenosos y heparina de bajo peso molecular respectivamente (empleadas en el tratamiento precoz del síndrome coronario agudo).

Diez pacientes se encontraban en un estado crítico preoperatorio. En los 10 casos, dicho estado vino dado por el uso de balón de contrapulsación previo a la intervención quirúrgica debido a que 8 padecían enfermedad de tronco coronario izquierdo y dos enfermedad de tres vasos con angina refractaria a tratamiento médico.

Se observó una puntuación media de la escala Framingham/ATP III alta (11.3 IC 95% 10.3- 12.3). Ello se explica por la alta prevalencia de distintos factores de riesgo

cardiovascular, la alta prevalencia de infartos miocárdicos previos y la elevada edad media de la muestra (67.5 años IC 95% 65.9- 69.1). La mortalidad media predicha según la escala EuroSCORE fue de 4.7% (IC 95% 3.5 – 5.9), lo que supone un riesgo moderado atendiendo a la clasificación de Ferguson (*Ferguson et al., 2002*).

Los niveles de glucemia fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes diabéticos (145 vs 104; $p=0.003$). También fue mayor la hemoglobina glicosilada media (7.4 vs 5.1%, $p=0.045$). Así mismo, podemos observar como, en el grupo de diabéticos, los niveles de hemoglobina (Hb) glicosilada revelaron un control subóptimo de la glucemia en los tres meses previos a la intervención. No se observaron diferencias significativas en los niveles de colesterol total ($p=0.081$), HDL ($p=0.123$) o LDL ($p=0.45$) entre pacientes diagnosticados de dislipemia y los que no la padecían. Esto se puede explicar en buena parte por el consumo generalizado de estatinas entre los pacientes de la muestra (91%), bien fuera para el tratamiento de su trastorno lipídico o como profilaxis primaria/secundaria de su enfermedad coronaria.

Variables	n (%)	Variables	n (%)
Sexo Femenino	20 (16.8)	IMC >30 Kg/m ² ***	20 (16.8)
Cirugía previa	1 (0.8)	Historia familiar de	4 (3.4)
Tabaquismo	65 (54.6)	Diabetes mellitus	49 (41.2)
Hipertensión arterial	89 (74.8)	Dislipemia	86 (72.3)
Arteriopatía periférica	17 (14.3)	EPOC ****	13 (10.9)
ACV previo *	6 (5)	Consumo antiplaquetarios	86 (72.3)
Heparina bajo peso	29 (24.4)	Nitratos intravenosos	8 (6.7)
Insuficiencia renal crónica	13 (10.9)	Infarto reciente (<90 días)	41 (34.5)
FEVi <50% **	28 (23.5)	PSAP > 60 mmHg *****	4 (3.4)
Estado crítico preoperatorio	10 (8.4)	Cirugía Urgente ††	1 (0.8)
NYHA III-IV *****	44 (37)		
Número de vasos coronarios enfermos			
1			6 (5)
2			39 (32.8)
3			72 (60.5)
Lesión severa del tronco coronario			36 (30.3)
Variable	Media	IC 95%	
Edad (años)	67.5	65.9- 69.1	
EuroSCORE (numérico)	4.1	3.6- 4.7	
EuroSCORE (logístico)	4.7	3.5- 5.9	
Framingham (numérico)	11.3	10.3- 12.3	
Colesterol total (mg/dL)	195	167- 229	
Colesterol HDL (mg/dL)	34	17- 51	
Colesterol LDL (mg/dL)	175	150- 221	
Glucemia (g/dL)	114	96- 152	
Hb glicosilada (%)	6.7	5.1- 8.6	

Tabla 7. Características basales de la muestra. Datos expresados con frecuencia absoluta (n) y relativa (%) o media e IC 95%.. * ACV: Accidente CerebroVascular. ** FEVi: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo. ***IMC: Índice de Masa Corporal. ****EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *****PSAP: Presión sistólica de la arteria pulmonar. ***** NYHA: New York Heart Association Dyspnea Classification. † Estado crítico se define como: intubación orotraqueal, parada cardiorrespiratoria, taquicardia ventricular o fibrilación ventricular, insuficiencia cardiaca congestiva aguda o necesidad de balón de contrapulsación en los momentos previos a la cirugía (Nashef *et al.*, 1999). †† Cirugía Urgente: aquella realizada en un plazo inferior a 24 h después de la indicación.

1.2. Características operatorias.

La Tabla 8 resume las características quirúrgicas más relevantes de la muestra. Se observó que la revascularización con injertos arteriales de arteria mamaria interna fue generalizada en la muestra (un 98.3% de los pacientes recibió al menos un bypass con este tipo de injerto). Después de la arteria mamaria, la vena safena interna fue el injerto vascular más empleado (70.6% de los pacientes).

La mayoría de los pacientes (91.6%, n=109) recibió al menos 2 injertos coronarios. Esto se corresponde con la distribución del número de vasos coronarios enfermos presentada en la tabla 7 (93.3%, n=111 pacientes presentaban enfermedad de dos o tres vasos).

Variables	n (%)
Revascularización completa	66 (55.5)
Uso de injerto de safena	84 (70.6)
Uso de injerto de mamaria	117 (98.3)
Uso de injerto de radial	1 (0.8)
Número de injertos coronarios	
1	10 (8.4)
2	52 (43.7)
3	50 (42)
4	7 (5.9)

Tabla 8. Características quirúrgicas de la muestra. Datos expresados con frecuencia absoluta (n) y relativa (%).

2. Perfil oxidativo pre y postoperatorio.

Al evaluar los distintos marcadores de estrés oxidativo antes y después de la intervención (Tabla 9), se observó como, globalmente, la cirugía de revascularización coronaria influyó de forma negativa en el estado oxidativo de los pacientes. Así, se observó un incremento significativo de los productos de oxidación lipídica (MDA plasmático ($p<0.001$) y de hematíes ($p<0.001$)). También se objetivó un aumento no significativo de un marcador de estrés nitrooxidativo como los niveles de peroxinitritos ($p=0.443$). De forma paralela se detectó una disminución significativa de los sistemas antioxidantes: SOD Mn ($p=0.07$), sin evidenciarse ninguna variación de glutatión reducido ($p=0.936$). También se registró una reducción de la concentración de nitritos si bien esta no resultó significativa ($p=0.078$) (podría explicarse por un aumento de la actividad iNOS por mediadores inflamatorios).

A tenor de estos resultados, parece deducirse que la cirugía de revascularización coronaria empeoró el estrés oxidativo de los pacientes con cardiopatía isquémica.

Variable	Preoperatorio	Postoperatorio	P
MDA plasmático (nmol/mg)	0.148 (0.119)	0.283 (0.171)	<0.001
MDA hematíes (nmol/mg)	0.193 (0.101)	0.365 (0.153)	<0.001
Peroxinitritos ($\mu\text{mol/g}$)	5.590 (3.116)	5.835 (3.286)	0.443
Nitritos ($\mu\text{mol/g}$)	11.549 (5.455)	9.606 (6.728)	0.078
Glutacion reducido ($\mu\text{mol/g}$)	3.367 (5.667)	3.402 (2.097)	0.936
Porcentaje de glutatión reducido (%)	26.139 (7.447)	25.661 (6.792)	0.405
SOD Mn (U/mL)	10.929 (8.447)	9.786 (7.491)	0.070

Tabla 9. Marcadores de estrés oxidativo pre y postoperatorios. Datos expresados en media (SD). Comparación de medias con pruebas T para muestras apareadas (previa comprobación de normalidad de las variables). Se consideran significativas $p<0.05$.

3. Factores de riesgo cardiovascular y perfil oxidativo.

Se analizó el perfil oxidativo en la muestra de pacientes del estudio según distintos factores de riesgo cardiovascular (Tabla 10, I, II, III, IV).

Observamos como el malondialdehído (MDA) plasmático se encontraba significativamente aumentado en mujeres ($p=0.007$), diabéticos ($p=0.006$), hipertensos ($p=0.011$) o dislipémicos ($p=0.003$). El MDA intracorpúscular (hematíes) estaba significativamente aumentado en mujeres ($p=0.023$), diabéticos ($p=0.002$), hipertensos ($p=0.027$), dislipémicos ($p=0.002$), arteriopatías ($p=0.003$) y pacientes con infarto previo ($p<0.001$). También se registró un aumento no significativo de los niveles de MDA en obesos, fumadores y pacientes con insuficiencia renal.

No se registraron diferencias significativas en los niveles de peroxinitritos según los distintos factores de riesgo cardiovascular estudiados. Sin embargo, sí se observó una tendencia hacia mayores concentraciones de nitritos en pacientes con factores de riesgo cardiovascular que, en el caso de los pacientes dislipémicos, llegó a ser estadísticamente significativas.

En cuanto a los distintos sistemas antioxidantes estudiados, no se registraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de GSH si bien sí se apreció una tendencia hacia menores concentraciones en pacientes con factores de riesgo cardiovascular y mujeres. No se observaron diferencias significativas en los niveles de SOD-Mn.

<i>Variables</i>		<i>SOD Mn (U/mL)</i>	<i>GSH (%)</i>	<i>GSH ($\mu\text{mol/g}$)</i>	<i>Nitritos ($\mu\text{mol/g}$)</i>	<i>Peroxini tritos ($\mu\text{mol/g}$)</i>	<i>MDA hematíes (nmol/mg)</i>	<i>MDA plasma (nmol/mg)</i>
<i>Sexo</i>	Varón (n=20)	11.979 (8.257)	28.346 (5.138)	3.517 (6.108)	11.6 (3.66)	5.456 (3.119)	0.184 (0.102)	0.134 (0.117)
	Mujer (n=99)	10.077 (8.477)	25.693 (7.775)	2.619 (2.519)	11.298 (2.215)	6.116 (3.172)	0.240 (0.087)	0.212 (0.107)
	p	0.285	0.247	0.520	0.723	0.499	0.023	0.007
<i>Historia familiar de cardiopatía isquémica</i>	No (n=115)	10.725 (8.323)	26.196 (7.55)	3.367 (5.758)	11.535 (3.495)	5.642 (3.183)	0.195 (0.101)	0.147 (0.119)
	Si (n=4)	16.788 (11.282)	24.5 (3.4)	3.338 (1.895)	11.948 (2.268)	4.535 (0.303)	0.146 (0.119)	0.167 (0.117)
	p	0.159	0.656	0.992	0.816	0.552	0.474	0.742
<i>Obesidad (IMC \geq 30 kg/m²)</i>	No (n=95)	10.904 (8.65)	26.649 (7.897)	3.699 (6.251)	11.454 (3.662)	5.505 (2.727)	0.195 (0.101)	0.142 (0.121)
	Si (n=20)	9.471 (4.475)	24.933 (4.392)	1.818 (1.645)	12.370 (2.462)	5.971 (4.538)	0.179 (0.087)	0.179 (0.096)
	p	0.474	0.350	0.186	0.288	0.639	0.518	0.203

Tabla 10.I. Factores de riesgo cardiovascular y perfil oxidativo. Se muestran medias (SD) o coeficiente B (IC 95%) según la variable independiente. Variables independientes en eje de ordenadas. Para variables cualitativas se analizaron las diferencias con T de Student o U de Mann Whitney. Para variables cuantitativas, se analizó la relación con regresión lineal simple. Diferencias significativas para $p < 0.05$.

<i>Variables</i>		<i>SOD Mn (U/mL)</i>	<i>GSH(%)</i>	<i>GSH (μmol/g)</i>	<i>Nitritos (μmol/g)</i>	<i>Peroxinit ritos (μmol/g)</i>	<i>MDA hematíes (mmol/L)</i>	<i>MDA plasma (mmol/L)</i>
<i>Antecedentes tabáquicos</i>	No (n=53)	11.696 (8.345)	26.375 (5.877)	4.168 (8.123)	11.078 (2.294)	5.984 (3.851)	0.173 (0.106)	0.130 (0.098)
	Si (n=65)	10.355 (8.602)	25.729 (9.071)	2.760 (2.133)	11.895 (4.163)	5.333 (2.499)	0.209 (0.095)	0.166 (0.129)
	p	0.395	0.642	0.182	0.203	0.419	0.058	0.096
<i>Diabetes mellitus</i>	No (n=69)	10.685 (8.559)	27.249 (9.08)	3.367 (2.2)	11.399 (4.217)	5.456 (3.550)	0.170 (0.107)	0.122 (0.108)
	Si (n=49)	11.228 (8.448)	25.296 (6.030)	3.419 (8.482)	11.739 (2.011)	5.703 (2.704)	0.227 (0.083)	0.185 (0.124)
	P	0.733	70.162	0.961	0.961	0.602	0.002	0.006
<i>Hipertensión arterial</i>	No (n=30)	12.510 (10.224)	26.805 (7.530)	5.117 (10.518)	10.675 (2.357)	5.443 (2.345)	0.158 (0.118)	0.195 (0.142)
	Si (n=89)	10.396 (7.752)	24.81 (5.539)	2.776 (2.284)	11.844 (3.718)	5.639 (3.354)	0.205 (0.093)	0.131 (0.106)
	p	0.237	0.093	0.236	0.110	0.830	0.027	0.011

Tabla 10.II. Factores de riesgo cardiovascular y perfil oxidativo. Se muestran medias (SD) o coeficiente B (IC 95%) según la variable independiente. Variables independientes en eje de ordenadas. Para variables cualitativas se analizaron las diferencias con T de Student o U de Mann Whitney. Para variables cuantitativas, se analizó la relación con regresión lineal simple. Diferencias significativas para $p < 0.05$.

<i>Variables</i>		<i>SOD Mn (U/mL)</i>	<i>GSH (%)</i>	<i>GSH (μmol/g)</i>	<i>Nitritos (μmol/g)</i>	<i>Peroxinit ritos (μmol/g)</i>	<i>MDA hematíes (mmol/L)</i>	<i>MDA plasma (mmol/L)</i>
<i>Dislipemia</i>	No (n=32)	9.749 (8.991)	25.518 (7.675)	3.035 (2.457)	10.513 (1.724)	4.549 (0.940)	0.146 (0.1)	0.197 (0.119)
	Si (n=86)	11.384 (8.296)	27.911 (6.702)	3.469 (6.504)	11.933 (3.864)	5.966 (3.694)	0.211 (0.097)	0.127 (0.112)
	p	0.354	0.122	0.715	0.007	0.090	0.002	0.003
<i>Arteriopatía periférica</i>	No (n=99)	11.094 (8.609)	26.919 (6.370)	3.478 (6.124)	11.459 (3.647)	5.699 (3.420)	0.185 (0.102)	0.143 (0.122)
	Si (n=20)	10.729 (8.092)	25.970 (7.681)	2.615 (2.106)	12.010 (2.331)	5.175 (1.070)	0.242 (0.081)	0.165 (0.104)
	p	0.717	0.631	0.568	0.549	0.635	0.030	0.489
<i>Insuficiencia renal crónica</i>	No (n=106)	10.911 (8.773)	28.824 (7.992)	3.467 (5.924)	11.584 (3.633)	5.738 (3.237)	0.193 (0.104)	0.148 (0.121)
	Si (n=13)	11.074 (5.318)	25.810 (7.350)	2.545 (2.826)	11.261 (1.331)	4.153 (0.364)	0.200 (0.077)	0.147 (0.101)
	p	0.925	0.169	0.582	0.751	0.238	0.806	0.986

Tabla 10.III. Factores de riesgo cardiovascular y perfil oxidativo. Se muestran medias (SD) o coeficiente B (IC 95%) según la variable independiente. Variables independientes en eje de ordenadas. Para variables cualitativas se analizaron las diferencias con T de Student o U de Mann Whitney. Para variables cuantitativas, se analizó la relación con regresión lineal simple. Diferencias significativas para $p < 0.05$.

<i>Variables</i>		<i>SOD Mn (U/mL)</i>	<i>GSH (%)</i>	<i>GSH (μmol/g)</i>	<i>Nitritos (μmol/g)</i>	<i>Peroxi- nitritos (μmol/g)</i>	<i>MDA hematíes (mmol/L)</i>	<i>MDA plasma (mmol/L)</i>
<i>Infarto miocárdico previo</i>	No (n=77)	11.530 (8.438)	28.597 (8.631)	4.096 (6.807)	11.175 (2.468)	5.881 (3.558)	0.161 (0.096)	0.144 (0.124)
	Si (n=49)	9.833 (8.558)	24.873 (6.470)	1.953 (1.888)	12.250 (4.781)	4.732 (1.452)	0.254 (0.083)	0.149 (0.107)
	P	0.306	0.009	0.051	0.109	0.171	<0.001	0.811
<i>Edad en años</i>	Coficiente B (SE)	-0.094	-0.155	-0.051	-0.082	-0.001	-0.001	0.002
	p	0.293	0.049	0.395	0.024	0.992	0.253	0.081
	IC 95%	-0.271- 0.082	-0.001- -0.309	-0.170- 0.068	-0.153- -0.011	-0.096- 0.095	-0.003- 0.001	0.000- 0.005

Tabla 10.IV. Factores de riesgo cardiovascular y perfil oxidativo. Se muestran medias (SD) o coeficiente B (IC 95%) según la variable independiente. Variables independientes en eje de ordenadas. Para variables cualitativas se analizaron las diferencias con T de Student o U de Mann Whitney. Para variables cuantitativas, se analizó la relación con regresión lineal simple. Diferencias significativas para $p < 0.05$.

Además, analizamos si existía alguna relación entre las disfunción ventricular (cuantificada mediante la presencia de hipertensión pulmonar o una fracción de eyección ventricular por debajo del 50%), y la extensión de la enfermedad coronaria (medida mediante el número de vasos enfermos y la lesión del tronco coronario izquierdo) con el perfil oxidativo. Ningún parámetro de estrés oxidativo estudiado se relacionó significativamente con ninguna de estas dos circunstancias (ver Tabla 11).

	Hipertensión pulmonar severa (PSAP > 60 mmHg)			Disfunción ventricular izquierda (FEVI < 50%)			Lesión severa del tronco coronario			Número de vasos enfermos		
	No (n=113)	Si (n=6)	p	No (n=89)	Si (n=28)	p	No (n=79)	Si (n=36)	p	Coficiente B (SE)	p	IC 95%
MDA plasma (mmol/L)	0.149 (0.120)	0.137 (0.106)	0.838	0.143 (0.108)	0.175 (0.142)	0.200	0.157 (0.123)	0.128 (0.111)	0.227	-0.012	0.528	-0.049- 0.025
MDA hemáticos (mmol/L)	0.193 (0.103)	0.228 (0.094)	0.504	0.192 (0.108)	0.196 (0.083)	0.884	0.203 (0.099)	0.168 (0.106)	0.085	0.023	0.159	-0.009- 0.054
Peroxitirritos (μmol/g)	5.607 (3.156)	3.761 (4.101)	0.564	5.717 (3.324)	5.166 (2.219)	0.588	5.918 (3.573)	4.991 (1.989)	0.295	1.054	0.102	-0.215- 2.323
Nitritos (μmol/g)	11.588 (3.511)	10.743 (2.539)	0.635	11.629 (3.798)	11.284 (2.153)	0.648	11.405 (2.469)	11.821 (5.109)	0.645	-0.099	0.857	-1.182- 0.985
GSH (μmol/g)	3.408 (5.802)	2.613 (1.801)	0.786	3.072 (2.432)	4.376 (10.925)	0.294	2.883 (2.213)	4.407 (9.711)	0.358	-0.571	0.0.524	-2.341- 1.199
GSSG (%)	26.012 (7.618)	28.323 (1.324)	0.547	25.608 (7.565)	27.531 (7.159)	0.237	26.562 (6.107)	25.184 (10.061)	0.366	0.931	0.430	-1.398- 3.259
SOD Mn (U/mL)	10.973 (8.249)	10.953 (15.721)	0.996	11.609 (8.718)	9.144 (7.546)	0.181	10.951 (8.660)	10.343 (7.478)	0.717	-1.342	0.315	--3.976- 1.292

Tabla 11. Extensión de daño coronario y disfunción ventricular y perfil oxidativo. Se muestran medias (SD) o coeficiente B (IC 95%) según la variable independiente. Variables independientes en eje de ordenadas Para variables cualitativas se analizaron las diferencias con T de Student o U de Mann Whitney. Para variables cuantitativas, se analizó la relación con regresión lineal simple. Diferencias significativas para $p < 0.05$.

Al aplicar una regresión logística binaria para determinar los factores predictores independientes de cada uno de los parámetros estudiados, observamos como el sexo femenino, la edad, el tabaquismo, y la diabetes predicen unos niveles aumentados de MDA plasmático. De igual manera, el sexo femenino, un infarto miocárdico previo, la dislipemia, la diabetes, el tabaquismo y la hipertensión arterial predicen niveles incrementados de MDA en hematíes. La dislipemia incrementa de forma independiente los niveles de nitritos en sangre mientras que la edad los disminuye. No se hallaron predictores independientes de GSH, SOD ni peroxinitritos (Tabla 12).

El no detectar mayores diferencias de los distintos parámetros estudiados ante la presencia de los diferentes factores de riesgo cardiovascular puede deberse en buena parte a un tamaño muestral insuficiente.

<i>Parámetro</i>	<i>Variables predictoras</i>	<i>P</i>	<i>B</i>	<i>IC 95%</i>
MDA plasmático	Sexo Femenino	<0.001	0.104	0.086- 0.262
	Diabetes mellitus	<0.001	0.070	0.033- 0.108
	Antecedentes tabáquicos	<0.001	0.074	0.035- 0.114
	Edad en años	0.027	0.002	0.001- 0.005
MDA hemáticas	Sexo Femenino	0.004	0.064	0.021- 0.107
	Infarto previo reciente	<0.001	0.096	0.064- 0.127
	Dislipemia	0.009	0.043	0.009- 0.077
	Antecedentes tabáquicos	0.001	0.057	0.026- 0.089
	Diabetes mellitus	0.021	0.037	0.006- 0.068
	Hipertensión arterial	0.034	0.038	0.003- 0.073
Peroxinitritos	Ninguno			
Nitritos	Edad en años	0.026	-0.80	-0.151- -0.1
	Dislipemia	0.049	1.383	0.002- 2.764
GSH	Ninguno			
SOD Mn	Ninguno			

Tabla 12. Predictores independientes de los distintos parámetros de estrés oxidativo estudiado. Regresión lineal múltiple. Datos expresados en coeficientes B (IC 95%) y grado de significación p. Se consideran significativas $p < 0.05$.

4. Perfil oxidativo, riesgo quirúrgico (EuroSCORE) y riesgo coronario (Framingham).

Se aplicó un test de regresión lineal simple para comprobar la relación entre los distintos parámetros de estrés oxidativo y las escalas de riesgo coronario (Framingham/ATP III numérica) y quirúrgico (EuroSCORE numérico) (ver Tabla 13). Se observó como el MDA en hematíes se correlacionaba de forma positiva con la escala Framingham ($p < 0.001$) y EuroSCORE ($p = 0.002$). Los niveles de nitritos ($p = 0.022$) también se relacionaban de forma positiva con la puntuación Framingham; mientras que los niveles de glutatión reducido lo hacían de forma negativa ($p = 0.043$). El MDA plasmático también se correlacionó de forma positiva con la puntuación EuroSCORE.

Además, al introducir todos los parámetros oxidativos en un análisis de regresión múltiple se obtuvieron modelos con buena capacidad predictiva de la escala Framingham ($R_a^2 = 0.673$) y EuroSCORE ($R_a^2 = 0.623$) (Tabla 14).

	<i>Framingham</i>			<i>EuroSCORE</i>		
	p	B	IC 95%	p	B	IC 95%
MDA plasmático	0.180	5.874	-2.743- 14.49	<0.001	9.496	5.151- 13.840
MDA hematíes	<0.001	32.146	24.132- 40.16	0.002	8.080	2.922- 13.238
Peroxinitritos	0.721	-0.83	-0.543- 0.378	0.320	-0.131	-0.392- 0.130
Nitritos	0.022	0.326	0.049- 0.604	0.828	0.017	-0.141- 0.175
GSH	0.043	-0.175	-0.344- -0.005	0.136	-0.072	-0.167- 0.023
SOD	0.559	-0.36	-0.159- 0.086	0.072	-0.058	-0.122- 0.005

Tabla 13. Perfil oxidativo y escalas de riesgo coronario (Framingham/ATP III) y riesgo quirúrgico (EuroSCORE). Datos expresados en coeficiente B con su IC 95%. Se consideran significativas $p < 0.05$.

<i>Modelos predictivos</i>		<i>R_a²</i>
Puntuación Framingham	5.58 -0.85xMDA(plasma) +31.5xMDA(hematíes) +0.02xPeroxinitrios +0.1xNitritos -0.16xGSH -0.09xSOD. Multiplicar x 1.3 si sexo fememino.	0.673
Puntuación EuroSCORE	3.24 +7.37xMDA (plasma) +7.1xMDA(hematíes) 0.101xPeroxinitritos -0.023 x Nitritos +0.045xGSH +0.54xSOD.	- 0.623

Tabla 14. Modelos predictivos de EuroSCORE y Framingham. R_a^2 expresa el porcentaje de variabilidad de la variable dependiente (escalas) que es capaz de explicar el modelo.

DISCUSIÓN

La aterosclerosis y sus complicaciones son las enfermedades más prevalentes en el mundo occidental. Son la primera causa de muerte en todo el mundo desarrollado y en nuestro país en particular (*Cooper et al., 2000; Yacer et al., 2001; Medrano et al., 2006*). Dada la extensión de esta enfermedad en la población general, y sus graves consecuencias para el individuo y la sociedad (costes económicos y consumo de recursos sanitarios), en los últimos 50 años se ha profundizado en el conocimiento de las causas y los mecanismos biomoleculares que conducen a su aparición, para así desarrollar medidas preventivas y terapéuticas que ayuden a controlar su impacto sobre nuestra sociedad. Los dos grandes estudios sobre los factores de riesgo cardiovascular, el *Framingham Heart Study* (*Lloyd-Jones et al., 1999*) y el INTERHEART (*Yusuf et al., 2004*), han determinado cuáles son los factores de riesgo cardiovascular “tradicionales”. A saber: diabetes mellitus, hipertensión arterial, tabaquismo, la dislipemia, los antecedentes familiares, la obesidad, el sedentarismo, etc. Todos ellos son inherentes al modo de vida occidental y explican, en buena parte, la alta incidencia de enfermedad coronaria en nuestro medio. Estos grandes estudios también han dado pie a la aparición de un enorme arsenal terapéutico destinado al tratamiento de la enfermedad coronaria, vascular cerebral y periférica así como de sus causas; y a grandes ensayos clínicos para demostrar la eficacia de unos u otros medios para el control de la aterosclerosis (HOPE, EUROPE, VALIANT, CAPRICORNIO,...)

En paralelo a estos grandes estudios comunitarios e internacionales, se suscitó el interés por conocer cuáles eran los mecanismos a nivel biomolecular de la aterogénesis. En 1999, Ross propuso que la aterogénesis era un proceso eminentemente inflamatorio en el que, de forma secundaria, se afectaban las

partículas lipídicas, el endotelio vascular, la pared muscular lisa de los vasos sanguíneos, etc. (Ross, 1999). Esta hipótesis supuso un punto de inflexión en la investigación básica de la aterosclerosis, hasta ese momento centrada en procesos protrombóticos (Bini et al., 1989) o anomalías lipídicas (Finking y Hanke, 1997). La hipótesis inflamatoria unificaba todas las teorías previas y planteaba la necesidad de investigar cómo los factores de riesgo cardiovascular y los mecanismos químicos inflamatorios influyen en la aterogénesis. Poco a poco, la hipótesis inflamatoria ha ido asentándose: se ha demostrado que las interleukinas (señales de respuesta inflamatoria), los reactantes de fase aguda (PCR, fibrinógeno, etc.), e incluso las propias células inflamatorias participan en la aterosclerosis.

Por otro lado, hace aproximadamente dos décadas, diversas líneas de investigación trataron de desentrañar los procesos moleculares de enfermedades degenerativas como el Alzheimer, el envejecimiento y distintos trastornos oncológicos. La mayoría de estos estudios centraban su interés en el papel de los radicales libres y el estrés oxidativo. En muchos de estos estudios se apreciaron ciertas similitudes entre los procesos degenerativos (que muchos se explicaban como trastornos inflamatorios crónicos) y la aterogénesis. La posible participación del estrés oxidativo en la inflamación y la aterogénesis ya la advirtió Ross al describir su hipótesis infamatoria de la aterosclerosis (Ross, 1999). En los últimos 10 años se ha comprobado que el desbalance de los sistemas enzimáticos de oxidorreducción se encuentra presente en la fisiopatología de la diabetes, la hipertensión, el tabaquismo, la hiperlipemia y la propia formación de la placa aterogénica en la pared vascular (Singh et al., 2005).

El conocimiento sobre estrés oxidativo y aterosclerosis aún se encuentra en plena eclosión. La mayoría de los estudios hasta la fecha se han realizado en modelos animales. No conocemos las concentraciones fisiológicas en humanos de los productos de oxidación ni de los radicales libres. Así mismo desconocemos cuáles son los sistemas enzimáticos redox que más influyen en la inflamación ni su funcionamiento fisiológico en los seres humanos. Desde un punto de vista traslacional, también son muchas las cuestiones por aclarar: ¿existe una relación entre el estrés oxidativo y el riesgo cardiovascular? ¿conseguirán disminuir la incidencia de enfermedad aterogénica las terapias antioxidantes (aspirina, alpha-tocoferol...)?

La cirugía coronaria es la cirugía cardíaca más frecuente en el mundo. Su objetivo es reperfundir territorios miocárdicos isquémicos debido a la obstrucción aterogénica de una o más arterias coronarias epicárdicas. La cirugía coronaria supone una importante noxa inflamatoria para el organismo y una reperusión miocárdica con una consecuente previsible modificación del estado de oxidación del mismo. Esta cirugía se asocia a una morbimortalidad variable según las características basales del paciente. El riesgo de aparición de complicaciones se valora en base a distintas escalas de riesgo, de las que EuroSCORE es la más aplicada y la que goza de más validez (*Nashef et al., 1999*).

Al desarrollar esta tesis, nos planteamos, desde una perspectiva traslacional, comprobar si, efectivamente, se podía establecer una relación entre estrés oxidativo, riesgo cardiovascular y riesgo quirúrgico en pacientes con enfermedad coronaria sometidos a una cirugía de revascularización coronaria.

Estrés oxidativo y factores de riesgo cardiovascular.

Muestra de pacientes.

Los pacientes seleccionados para este estudio fueron pacientes con enfermedad aterosclerótica coronaria avanzada, todos ellos candidatos a una cirugía de revascularización coronaria. Ello explica la elevada prevalencia de factores de riesgo cardiovascular como hipertensión arterial (74.8%), tabaquismo (54.8%), dislipemia (72.3%), o diabetes mellitus (41.2%); y la elevada edad media de la muestra (67.5 años). Como el estudio INTERHEART (*Yusuf et al., 2004*), estos factores justifican, de forma aislada, una buena parte del riesgo atribuible al primer infarto miocárdico y, en nuestra muestra de pacientes, el alto riesgo coronario.

Otro ejemplo que describe claramente el riesgo coronario de nuestra población de pacientes fue la elevada puntuación media Framingham/ ATP III. Una puntuación media de 16.3 en la muestra supone un alto riesgo coronario. En el sexo femenino, la puntuación media fue de 21.2 (IC 95% 18.6- 26.3) (riesgo coronario en el plazo de 10 años entre un 14 y un 17%) (*D'Agostino et al., 2008*). Entre los varones, la puntuación media fue de 14.4 (IC 95% 12.3- 15.6) (riesgo cardiovascular de entre un 16 y un 20%).

Un elevado porcentaje de pacientes había padecido un infarto miocárdico previo (34.5%), sufría arteriopatía periférica (14.3%) o diabetes mellitus (41.2%). Todos ellos se consideran equivalentes de enfermedad aterosclerótica avanzada (*Wilson et al., 1998; D'Agostino et al., 2001; National Education Program 2002*).

Con todos estos datos podemos concluir que el riesgo coronario de los pacientes de este estudio fue alto. Esto se explica por los criterios de selección empleados: todos

fueron pacientes con enfermedad coronaria avanzada candidatos a una cirugía de revascularización miocárdica.

La mayoría de los pacientes de la muestra padecían enfermedad de dos o tres vasos coronarios (32.8% y 60.5%). Además, un 30.3% de los pacientes tenía enfermedad del tronco coronario. Todas ellas son indicaciones de cirugía coronaria según las guías clínicas terapéuticas actuales (*Eagle et al., 2004; Kohl et al., 2010*). Además, un 43.5% de los pacientes presentaba disfunción ventricular izquierda (FEVi<50%) debido a las alteraciones de la contractilidad miocárdica secundarias a la isquemia/necrosis miocárdica.

La mortalidad media predicha postoperatoria de los pacientes fue de un 4.7% (IC 95% 3.5- 5.9), según la escala de riesgo EuroSCORE (*Nashef et al., 1999*). Esta puntuación corresponde a un riesgo quirúrgico moderado (*Ferguson et al., 2002*).

En cuanto a la técnica de revascularización se refiere, la mayoría de los pacientes (n=117 (98.3%)) recibió un injerto de arteria mamaria pues es el injerto que demuestra mayor permeabilidad a largo plazo. El uso de injertos venosos también fue mayoritario (70.6% de la muestra). La mayoría de los sujetos recibió dos o tres injertos coronarios (43.7% y 42% respectivamente), lo que se corresponde con la distribución de vasos enfermos de la muestra.

Cirugía coronaria y modificación del perfil oxidativo.

El aumento agudo de los productos de oxidación se produce de manera fisiológica en los seres humanos como respuesta a un estímulo inflamatorio (infeccioso o de otra causa). Su finalidad última es la de promover la aparición de radicales libres

que estimulan la respuesta inflamatoria celular, la activación del complemento, la quimiotaxis leucocitaria, etc. para responder a dicho estímulo. Además, se ha comprobado como la reperfusión de los tejidos isquémicos también conduce a un estrés oxidativo.

Una cirugía mayor supone un estímulo inflamatorio importante para el organismo y conlleva la reperfusión del miocardio. Cualquier cirugía cardiaca mayor, independientemente del uso de circuitos de circulación extracorpórea, produce una activación plaquetaria, leucocitaria, del sistema de la bradiquinina-calicreína, del complemento, etc. que en algunos casos puede llegar a desencadenar el denominado síndrome de respuesta inflamatoria severa (SIRS) (caracterizado por una pérdida masiva de la permeabilidad capilar por una respuesta inflamatoria exacerbada) (*Wachtfogel et al, 1989; Despotis et al., 1994*). Sin embargo, hasta ahora no se ha investigado si esta respuesta inflamatoria a la cirugía se acompaña, como es previsible, de un incremento del estrés oxidativo.

Nuestro estudio (tabla 9) evidenció un importante incremento de los niveles de malondialdehído después de la cirugía (MDA plasmático: 0.148mmol/L Vs. 0.283 mmol/L, $p<0.001$; MDA en hematíes: 0.193mmol/L Vs. 0.365 mmol/L, $p<0.001$). Así mismo, se observan incrementos no significativos de los niveles de peroxinitritos y nitritos y una disminución de los niveles de SOD-Mn y glutatión reducido. Posiblemente, el tamaño muestral nos haya impedido detectar diferencias estadísticamente significativas en los parámetros mencionados anteriormente (salvo MDA). De cualquier manera, se observa una tendencia clara hacia un aumento de la

actividad oxidativa y una disminución de la antioxidante de forma secundaria a la cirugía.

El descubrimiento del SRIS hace ya varias décadas contribuyó a mejorar el diseño de los circuitos de circulación extracorpórea para atenuar la intensidad y la incidencia de aquél. Dado que también existen alteraciones del estrés oxidativo en la cirugía cardíaca, sería interesante conocer cuáles son sus repercusiones clínicas, e investigar, si las hubiere, posibles medidas tecnológicas, farmacológicas o quirúrgicas para minimizarlas. Sin duda alguna, este propósito resulta ambicioso desde la perspectiva meramente observacional de este estudio, pero puede, en un futuro, ayudarnos optimizar el abordaje del paciente con enfermedad coronaria sometido a una revascularización quirúrgica.

Factores de riesgo cardiovascular y estrés oxidativo.

Los estudios sobre la relación entre distintos factores de riesgo cardiovascular y estrés oxidativo son, hasta la fecha, escasos y en su mayoría basados en modelos animales. Estos estudios han tratado de dilucidar el papel de distintos sistemas enzimáticos oxidorreductores y radicales libres en la aterogénesis.

Rueckschloss demostró la relación entre el aumento de la producción del anión superóxido (secundario a una alteración de la función NADPH oxidasa) en el incremento de la oxidación de las partículas LDL y su acúmulo subintimal (*Rueckschloss et al., 2001*) en muestras de arterias mamarias de pacientes humanos diabéticos.

En la muestra de pacientes analizados en este estudio, se detectó un incremento significativo de MDA en hematíes (0.146 Vs. 0.211 mmol/L; $p=0.002$) y nitritos (10.513

$\mu\text{mol/g}$ Vs. 11.933; $p=0.007$) en sangre periférica en pacientes dislipémicos frente a no dislipémicos. También se detectaron incrementos no significativos de GSH ($p=0.715$) y SOD- Mn ($p=0.354$). Curiosamente, se observó una disminución de los niveles de MDA plasmáticos en los pacientes dislipémicos (0.127 Vs 0.197 mmol/L; $p=0.003$). El aumento de los niveles de nitritos y MDA en hematíes podría demostrar la existencia de estrés oxidativo en los pacientes dislipémicos de nuestra cohorte. Sin embargo, la disminución de los niveles de MDA plasmático y el aumento de determinadas sustancias y enzimas antioxidantes parecían contradictorios con esta hipótesis. En su trabajo, Rueckschloss et al. advirtieron del posible efecto antioxidante de los inhibidores de la HMGCoA. La mayoría de los pacientes dislipémicos de nuestra muestra consumía estatinas (inhibidores de la HMGCoA) en el momento de la intervención a pesar de que este dato no se haya valorado. Es posible que el consumo generalizado de estatinas en nuestra muestra de pacientes justifique la paradójica disminución de MDA plasmático y el aumento de los niveles de SOD y glutatión reducido. Cuando analizamos cuáles fueron los parámetros que modificaban de forma independiente los distintos parámetros oxidativos, observamos que la dislipemia incrementaba de forma independiente los niveles de MDA en hematíes ($B=0.043$, $p=0.009$) y nitritos ($B=1.383$, $p=0.049$). A tenor de estos resultados, la dislipemia parece empeorar el estrés oxidativo en pacientes con aterosclerosis.

La diabetes mellitus es una circunstancia patológica que potencia el estrés oxidativo y la aterogénesis. La hiperglucemia induce la glicación no enzimática de las lipoproteínas fijándolas a la pared vascular y favorece la producción de ROS la oxidación lipídica (*Nishikawa et al., 2000; Rosen et al., 2001*). De hecho, se han

detectado en arterias de pacientes diabéticos niveles aumentados de MDA y otros productos de oxidación lipídica (*Soro-Paavonen et al., 2008*). La resistencia a la insulina observado en la diabetes mellitus tipo 2 sin duda induce a la aparición de dislipemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, etc... todos ellos factores que de un modo u otro también promueven el estrés oxidativo y la aterogénesis. En nuestro estudio encontramos un incremento de los niveles plasmáticos y en hematíes de MDA (0.122 Vs 0.185 mmol/L, $p=0.006$; y 0.170 Vs. 0.227, $p=0.002$ respectivamente). De forma análoga se detectó un aumento no significativo de peroxinitritos y nitritos en sangre periférica, así como de GSH y SOD-Mn. Este estudio también detectó, pues, un incremento de los productos de oxidación lipídica en pacientes diabéticos, como el de *Soro-Paavonen et al.*, mencionado anteriormente. Al ponderar el efecto de la diabetes sobre los distintos parámetros oxidativos evaluados en el presenta trabajo, también observamos como aquella incrementaba de forma independiente los niveles de MDAP ($B=0.07$; $p<0.001$) y MDAh ($B=0.037$; $p=0.021$).

Múltiples estudios han demostrado la relación del estrés oxidativo e hipertensión arterial. Se ha demostrado como el estrés oxidativo induce la formación de la angiotensina, y esta favorece la formación de superóxido a través de la NADP oxidasa. Aquel, a su vez, disminuye la disponibilidad de NO endotelial. El estrés oxidativo puede ser, por tanto, consecuencia y causa de la hipertensión arterial. Aún hoy se investigan nuevos mecanismos moleculares que expliquen y aclaren esta relación (*Varizi et al., 2001; Taniyama y Griendling, 2004; Rodríguez- Iturbe et al., 2007*). En nuestra muestra de pacientes, la hipertensión incrementaba de forma significativa los niveles de MDAh (0.158 mmol/L Vs. 0.205; $p=0.027$) y disminuía los de MDAP (0.195 mmol/L Vs. 0.131;

$p=0.011$). Se observó, así mismo, un aumento no significativo de los productos de oxidación: nitritos y peroxinitritos; y una disminución de parámetros antioxidantes como SOD y glutatión. De nuevo, la paradójica disminución de los niveles de MDAp no puede explicarse por los datos recogidos en este estudio. Puede que el uso de fármacos inhibidores, antioxidantes como AAS, la restricción de grasas animales en la dieta y determinados fármacos antihipertensivos hubiera influido en esta disminución contradictoria de los niveles de MDAp en el subgrupo de pacientes hipertensos de nuestra muestra. En el análisis multivariante, se observó como la hipertensión arterial aumentaba de forma independiente los niveles de MDAp en los pacientes incluidos ($B=0.038$, $p=0.034$). Este trabajo avala los resultados de otros antes mencionados en los cuales se observó una relación entre hipertensión y estrés oxidativo.

La arteriopatía periférica y el infarto miocárdico previo son ambos indicativos de una enfermedad aterosclerótica avanzada e incrementan de forma notoria el riesgo de enfermedad coronaria (*D'Agostino et al., 2001; D'Agostino et al., 2008*). En nuestra muestra, los pacientes que padecían arteriopatía periférica o un infarto miocárdico previo presentaban niveles incrementados de MDAh ($p=0.030$ y $p<0.001$ respectivamente). La medición del resto de parámetros no demostró ninguna otra diferencia significativa; si bien es cierto que se observó una tendencia hacia el incremento de los productos de oxidación y una disminución de los mecanismos antioxidantes. Estos resultados son una consecuencia lógica a tenor de todo lo discutido anteriormente. Los pacientes con enfermedad aterosclerótica avanzada, como son estos dos subgrupos, tendrían un perfil oxidativo adulterado a expensas de un mayor estrés oxidativo.

La insuficiencia renal crónica incrementa el riesgo cardiovascular (*Antman et al., 2004*). Hasta la fecha, ningún estudio ha intentado dilucidar si esta relación puede explicarse a través de una alteración del metabolismo oxidativo. En ese trabajo no hemos detectado ninguna anomalía significativa de los parámetros estudiados entre los pacientes con y sin insuficiencia renal crónica.

Tampoco hallamos diferencias significativas en los pacientes con antecedentes familiares de cardiopatía isquémica ni en obesos. Posibles mecanismos intermedios que involucren al estrés oxidativo, el daño aterogénico y estos dos factores de riesgo no han sido investigados hasta hoy.

El estrés oxidativo ha sido estudiado como mecanismo patogénico del daño celular alveolar en los pacientes fumadores que desarrollan enfermedad pulmonar obstructiva crónica y cáncer de pulmón (*Faux et al., 2009*). El tabaquismo produce importantes alteraciones del estrés oxidativo a través de la inhalación directa de sustancias cuyo metabolismo genera radicales libres o de sustancias que inhiben sistemas antioxidantes (*Faux et al., 2009*). Sin embargo, no se ha estudiado aún el papel del estrés oxidativo como mecanismo del daño aterogénico en los fumadores. En nuestra muestra, hemos detectado una tendencia hacia el incremento de sustancias derivadas de la oxidación lipídica (MDAp y MDAh), y una disminución de los niveles de glutatión reducido y SOD-Mn. Además, el consumo de cigarrillos aumentó de forma independiente los niveles de MDAh ($B=0.057$, $p=0.001$) y MDAp ($B=0.074$, $p<0.001$) al ponderar en un análisis multivariante el efecto de cada factor de riesgo cardiovascular sobre los parámetros analizados.

La edad es un proceso degenerativo que afecta inespecíficamente a todos los sistemas enzimáticos del organismo. De forma inversa, el deterioro de la actividad de algunos sistemas enzimáticos, entre ellos los involucrados en la formación y destrucción de especies reactivas de oxígeno, contribuye a una aceleración del envejecimiento y a la aparición de muchas de las enfermedades degenerativas asociadas a la edad. Esto puede explicar por qué enfermedades como el Alzheimer, la demencia o determinados procesos neoplásicos son más prevalentes en edades más avanzadas. Además, el envejecimiento conlleva un incremento en la prevalencia de determinados factores de riesgo cardiovascular como la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión arterial, la resistencia a la insulina, el sedentarismo, la menopausia en la mujer... Todos estos factores contribuyen a incrementar en paralelo el estrés oxidativo y el riesgo cardiovascular.

En este trabajo hallamos un incremento lineal de los niveles de MDA plasmático con la edad (coeficiente $B = 0.002$ nmol/mg/año, IC 95% 0.0001 y 0.005) (Tabla 10). No encontramos diferencias relaciones en el resto de parámetros observados. Al ponderar el efecto de la edad sobre el incremento de MDA, observamos que la edad aumentaba de forma independiente y significativa los niveles de MDA ($B = 0.002$, $p = 0.027$) (Tabla 12). Un incremento de la oxidación lipídica y de ácidos nucleicos ya fue descrita por Kubovetz (*Kubovetz et al., 2003*). Este trabajo es el primero en corroborar dichos datos en sujetos humanos con enfermedad coronaria. De forma paradójica, observamos una disminución de los niveles de nitritos con la edad ($B = -0.80$, $p = 0.026$) (Tabla 2). No existe ningún estudio publicado en la literatura al respecto. Como posible explicación a

este hallazgo, cabe especular con la posibilidad de que un deterioro de la actividad de la NOS pueda influir en una deplección global de los niveles de NO y sus metabolitos.

Intentamos, así mismo, determinar si existía alguna relación entre el estrés oxidativo y algunos de los parámetros de disfunción cardíaca secundaria a la cardiopatía isquémica (como la disfunción ventricular izquierda y la hipertensión pulmonar), así como con marcadores de extensión del daño coronario (como el número de vasos y la afectación o no significativa del tronco coronario izquierdo) (Tabla 11). A pesar de resultar dos relaciones aparentemente lógicas, con los datos de este estudio no pudimos determinar si esta relación existe o no. Es necesario incluir un mayor número de pacientes en la muestra para llegar a alguna conclusión en este sentido.

En conjunto, este estudio es el primero que, *de forma global*, demuestra la alteración de distintos parámetros oxidativos subyacente a distintos factores de riesgo cardiovascular en pacientes humanos con enfermedad coronaria.

Estrés oxidativo y riesgo cardiovascular.

Otro de los objetivos de este proyecto fue investigar si era posible determinar el riesgo cardiovascular y el riesgo operatorio con los parámetros de estrés oxidativo estudiados. Sin duda alguna, la posibilidad de validar este hecho tan sólo es posible en un estudio a largo plazo pues la escala Framingham valora el riesgo coronario a 10 años (*D'Agostino et al., 2008*); y la escala EuroSCORE se ha validado como predictora de mortalidad y eventos adversos a corto y medio plazo tras una cirugía (*Nashef et al,*

1999; Ferguson 2002). Sin embargo, y para sentar las bases de futuras líneas de investigación sí estudiamos si, al menos, éramos capaces de predecir las puntuaciones de estas escalas con los parámetros estudiados.

En una primera fase, estudiamos la relación entre cada uno de los parámetros estudiados y la escala Framingham (Tabla 13), hallando relaciones significativas positivas con ésta de los niveles de MDAh ($p<0.001$) y nitritos ($p=0.022$); y negativas con GSH ($p<0.043$). Así mismo se determinó que existían relaciones positivas no significativas entre MDAh y puntuación Framingham y negativas con SOD y Framingham. Es decir, estados más avanzados de estrés oxidativo (con aumento de la oxidación y disminución de sistemas reductores) predicen un aumento de la puntuación Framingham, que, recordemos, a su vez predice un mayor riesgo coronario. Al construir un modelo predictor (Tabla 14) incluyendo el sexo (dado el peso modificador de esta variable en la escala Framingham (*D'Agostino et al., 2008*)), observamos como la puntuación Framingham aumenta con los niveles de MDAp, MDAh, Peroxinitritos y Nitritos y con el sexo femenino, mientras que disminuye con los niveles de SOD y GSH. Además de ser un modelo con sentido casual y plausibilidad biológica, resulta interesante que dicho modelo es capaz de predecir la puntuación Framingham con una buena certidumbre ($R^2=0.673$); es decir, es capaz de predecir el 67.3% de la variabilidad de la escala Framingham hallada en nuestra muestra.

En el caso de la escala EuroSCORE (tabla 13) se observó una correlación positiva y significativa entre los niveles de MDAp y MDAh y la puntuación EuroSCORE ($p<0.001$ y $p=0.002$ respectivamente). De forma análoga, se encontraron relaciones no significativas positivas entre nitritos y EuroSCORE y negativas entre SOD y EuroSCORE.

En el modelo matemático predictivo de la puntuación EuroSCORE, hallamos que dicha puntuación aumentaba con los niveles de MDAp y MDAh, y disminuía con los de nitritos, peroxinitritos, GSH y SOD. La capacidad predictiva de este modelo también resultó elevada ($R_a^2=0.623$).

El hecho de que dispongamos de dos modelos capaces de predecir de forma precisa el valor de escalas de riesgo coronario y postoperatorio en nuestra muestra de pacientes nos lleva a la idea intuitiva de que tal vez sea posible predecir el riesgo coronario y quirúrgico en la población con enfermedad coronaria. Este no es el objetivo de este estudio, pero sin duda le confiere un enorme valor traslacional, puesto que sentamos las bases para que, en base a la determinación de la actividad oxidativa de un individuo podamos, en un futuro, prever su riesgo coronario y actuar en consecuencia con las correspondientes medidas farmacológicas o higiénicas.

CONCLUSIONES

Conclusiones.

- I. La cirugía de revascularización miocárdica empeoró el estrés oxidativo en los pacientes coronarios sometidos a una cirugía de revascularización en el postoperatorio inmediato, sobre todo a expensas de un incremento de los productos de oxidación lipídica (MDAp y MDAh).
- II. En la muestra del estudio, se observó que el sexo femenino, la edad, la diabetes y el tabaquismo incrementaron los niveles de malondialdehído en plasma humano. El sexo femenino, el infarto previo, el tabaquismo, la diabetes y la hipertensión aumentaron los niveles de MDA en hematíes. La dislipemia aumentó los niveles de nitritos en sangre y la edad los disminuyó.
- III. Los niveles de los productos de oxidación lipídica (MDA) predijeron peores puntuaciones en la escala Framingham y EuroSCORE en la muestra estudiada.
- IV. Fue posible predecir las puntuaciones de las escalas de riesgo coronario (Framingham) y quirúrgico (EuroSCORE) en base a los parámetros de estrés oxidativo estudiados en nuestra muestra.

BIBLIOGRAFÍA

A.

Abaci A, Oguzhan A, Kahraman N S, Eryol NK, Unal S, Arinch H, Ergin A. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation*. 1999; 99: 2239-2242.

Alexander RW. Inflammation and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1994; 331: 468–469.

Almdal, T, Scharling, H, Jensen, JS, Vestergaard, H. The independent effect of type 2 diabetes mellitus on ischemic heart disease, stroke, and death: a population-based study of 13,000 men and women with 20 years of follow-up. *Arch Intern Med* 2004; 164:1422.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2005; 28: S37-S42.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2007. *Diabetes Care* 2007; 30: S4-S41.

Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T, Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 1999; 104: 1631–1639.

Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction. Available at: www.acc.org/qualityandscience/clinical/statements.htm.

Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, Cunniffon C, Tousoulis D, Pillai R, Ratnatunga C, Stefanadis C, Channon K.. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2009; 9: 1142- 1150.

Antoniades C, Tousoulis D, Stefanadis C. Effect of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on oxidative stress, inflammatory status and coronary atherosclerosis: an example of transient phenotype. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49: 1226.

Antoniades C, Tousoulis D, Marinou K. Effects of lipid profile on forearm hyperemic response in young subjects. *Hellenic J Cardiol*. 2006; 47: 152-157.

Armstrong PW. Defining myocardial infarction: a work in progress: Ischaemic heart disease. *Heart*. 2008;94:1076-9.

Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* 2002; 1:1.

Aydin A, Orhan H, Sayal A, Özata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemia control. *Clin Biochem* 2001; 34:65-70.

B.

Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood*. 2000; 95: 3442–3450.

Ballinger S, Patterson C, Conklin CA, Hu Z, Hunter GVC, McIntyre K, Runge MS. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* 2002; 106: 544–549.

Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today*. 1994; 15: 74–80.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A New class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997; 385: 640-644.

Beck CS. A new blood supply to the heart by operation. *Ann Surg*. 1935; 102: 801-813.

Becker C. Ying and yang of MCP-1. *Circ Res*. 2005; 96: 812-814.

Becker RC, Cannon CP, Bovill EG, Tracy RP, Thompson B, Knatterud GL, Randall A, Braunwald B. Prognostic value of plasma fibrinogen concentration in patients with unstable angina and non-Q wave infarction enrolled in the TIMI III trial. *Am J Cardiol*. 1996; 78: 142–147.

Beckman J, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology and management. *JAMA*. 2002; 287: 2570-2581. (2)

Belik J, Jankov RP, Pan J, Tanswell AK. Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37:1384-1392.

Bellido I, de la Cruz JP, Sánchez de la Cuesta F. The pyrimido-pyrimidine derivative RA-642: a potent inhibitor of ferrous-induced lipid peroxidation in cell membranes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1991 Jul-Aug;13(6):371-5.

Bemelman MH, Van Tits LJ, Buurman WA. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Critl Revi Immunol*. 1996; 16: 1–11.

Bergman B, Kranjčević K, Reiner Z, Milaković SB, Stojanović SŠ. Drug therapy of cardiovascular risk factors: guidelines versus reality in primary Health Care Service. *Croat Med J.* 2005; 46: 984-989.

Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91: 2488–2496.

Beyers LM, Braam B, Post JA, Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, Verhaar MC, Joles JA, Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase, *Hypertension* 2006; 47: 87–94.

Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR. Interleukin 1 induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med.* 1984; 160: 618–623.

Biancaril F, Lahtinen J, Lepojärvi S, Rainio P, Salmela E, Pokela R, Lepojärvi M, Satta J, Juvonen TS. Preoperative C-Reactive protein and outcome after coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Surg.* 2003; 76: 2007–2012.

Biasucci LM, Centre for Disease Control, American Heart Association. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Health Practice: clinical use of inflammatory markers in patients with cardiovascular disease: a background paper. *Circulation* 2004;110:e560-7.

Bini A, Fenoglio JJ, Mesa-Tejada R, Kudryk B, Kaplan KL. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrinogen degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis.* 1989; 9: 109–121.

Bird RP, Draper HH. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol* 1984;105:299-305.

Black S, Kushner I, Salmols D. C-reactive protein. *J Biol Chem.* 2004; 279: 48487–48490. (2)

Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ; VIGOR STUDY GROUP. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen inpatients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1520-1528.

Bourcier T, Sukhova G, Libby P. The nuclear factor kappa-B signalling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem.* 1997; 272: 15817-15824.

Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res.* 2005; 65:16-27. (2)

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813-820.

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988; 318: 1315-1321.

Buege JA, Aust SD. On the solubilization of NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes with crude pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta* 1972; 286:433-6.

Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*. 2002; 105: 1816–1823.

C.

Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24:471-478.

Chakrabarti S, Cukiernik M, Hileeto D, Evans T, Chen S. Role of vasoactive factors in the pathogenesis of early changes in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16: 393-407.

Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004; 95: 858-866.

Chobanian, AV, Bakris, GL, Black, HR, Cushman, WC. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003; 289:2560.

Choudhury RP, Fuster V, Fayad SA. Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. *Nature reviews*. 2004; 3: 915-925.

Clark JM. Interacting effects of hypoxia adaptation and acute hypercapnia on oxygen tolerance in rats. *J Appl Physiol* 1984;56:1191-8.

Cipollone F, Rocca B, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 246-255.

Coccheri S. Approaches to prevention of cardiovascular complications and events in diabetes mellitus. *Drugs* 2007;67:997-1026.

Cohen S. Cytokine: more than a new word, a new concept proposed by Stanley Cohen thirty years ago. *Cytokine* 2004; 28: 242–247.

Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol* 1974; 12: 150–159.

Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. The type II ‘decoy’ receptor: a novel regulatory pathway for interleukin-1. *Immunol Today*. 1994; 15: 562–566.

Cooper R, Cutler J, Desvigne-Nickens P, Fortmann SP, Friedman L, Havlik R, Hogelin G, Marler J, McGovern P, Morosco G, Mosca L, Pearson T, Stamler J, Stryer D, Thom T. Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the United States: Findings of the National Conference on Cardiovascular Disease Prevention. *Circulation* 2000; 102:3137-47.

Cosenzi A, Bernobich E, Bonavita M, Trevisan R, Bellini G, Campanacci L. Early effects of diabetes on inducible nitric oxide synthase in the kidney. *Acta Diabetol* 2002;39:91-96.

D.

D’Agostino RB, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups Investigation. *JAMA*. 2001; 286: 180–187.

D’Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care. The Framingham Heart Study. *Circulation* 2008, 117:743-50.

Dalsing MC, Grosfeld JL, Shiffler MA, Vane DW, Hull M, Baehner RL, Weber TR. Superoxide dismutase: a cellular protective enzyme in bowel ischemia. *J Surg Res* 1983;34:589-96.

Dandona P. Effects of antidiabetic and antihyperlipidemic agents on C- reactive protein. *Mayo Clin Proc*. 2008;83:333-42.

Darley-Usmar V, Halliwell B. Blood Radicals. Reactive Nitrogen Species, Reactive Oxygen Species, Transition Metal Ions, and the Vascular System. *Pharm Res* 1996; 13:649-657.

Dauche, L, Amouyel P, Dallongeville J. Fruit and vegetable consumption and risk of stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Neurology* 2005; 65:1193- 200.

Daugherty A, Dunn JI, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1994; 94: 437-444.

Davi G, Falco A, Patrono C, Determinants of F2-isoprostane biosynthesis and inhibition in man. *Chem Phys Lipids* 2004;128:149–163.

De La Cruz JP, Villalobos MA, Carrasco T, Smith-Agreda JM, Sánchez de la Cuesta F. The pyrimido-pyrimidine derivative RA-642 protects from brain injury in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia reperfusion. *Brain Res* 1992; 597:250-6.

Dennis C, Spreng DS, Nelson GE, Karlson KE, Nelson RM. Development of a pump-oxygenator to replace the heart and lungs: an apparatus applicable to human patients and application to one case. *Ann Surg* 1951; 134: 709-21

Derosa G, Gaddi AV, Piccinni MN, Salvadeo S, Ciccarelli L, Fogari E, Ghelfi M, Ferrari I, Cicero AF. Differential effect of glimepiride and rosiglitazone on metabolic control of type 2 diabetic patients treated with metformin: a randomized, double-blind, clinical trial. *Diabetes Obes Metab*. 2006;8:197-205.

Devlin CM, Kuriakose G, Hirsch E, Tabas I. Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 6280–6285.

Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Fragiogiannis NG. CCL2/monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*. 2005; 96: 881-889.

Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 2394 –2400.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2000; 18:655-673.

Didion SP, Faraci FM. Effects of NADH and NADPH on superoxide levels and cerebral vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H688-H695.

Dinarello CA. Biological bases for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095–2147.

Dinarello CA. IL-18: a T-H1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103: 111–124.

Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997; 8: 253–265.

Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med*. 1993; 328: 106–113

Dische S, Saunderson M. Translational research – a new entity?. *Acta Oncologica*. 2001; 40: 995-999.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 47-95.

E.

Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, Edwards FH, Ewy GA, Gardner TJ, Hart JC, Herrmann HC, Hillis LD, Hutter AM Jr, Lytle BW, Marlow RA, Nugent WC, Orszulak TA; American College of Cardiology; American Heart Association. ACC/AHA 2004 guideline update for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery). *Circulation.* 2004;110:e340-437.

Edwards WES, Jones WB, Dear HD, Kerr AR. Direct surgery for coronary artery disease: techniques for left anterior descending coronary artery bypass. *JAMA* 1970;211:1182-4.

Effler DB, Sones FM, Favarolo R, Groves LK. Coronary endarterectomy with patch-graft reconstruction: clinical experience with 34 cases. *Ann Surg* 1965;162:590- 601.

Effler DB, Sones FM, Groves LK, Suarez E. Myocardial revascularization by Vineberg's internal mammary artery implant: evaluation of postoperative results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1965;50:527-532.

EUROASPIRE II Study Group. Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries; principal results from EUROASPIRE II euro heart survey programme. *European Heart Journal.* 2001; 22: 554–572.

F.

Fabris F, Zanolchi M, Bo M, Fonte G, Poli L, Bergoglio I, Ferrario E, Pernigotti L. Carotid plaque, aging and risk factors. *Stroke.* 1994; 25: 1133-1140.

Favarolo RG. Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease: operative technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969;58:178-185.

Falk E, Fuster V. Chap V: Atherogenesis and its determinants. In *Hurst's the Heart*. 11th edition. Editors V. Fuster et al. McGraw-Hill. 2004, New York.

Favaloro RG, Effler DB, Groves LK. Severe segmental obstruction of the left main coronary artery and its divisions. Surgical treatment by saphenous vein graft technique. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1970; 60: 469-474.

Ferguson B, Hammill BG, Peterson ED, DeLong ER, Grover FL for the STS National Database Committee. A decade of change—risk profiles and outcomes for isolated coronary artery bypass grafting procedures, 1990–1999: a report from the sts national

database committee and the duke clinical research institute. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73: 480-490. (2)

Finking G, Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis.* 1997; 135: 1-7.

Flemma RJ, Johnson WD, Lepley D. Triple aorto-coronary vein bypass as treatment for coronary insufficiency. *Arch Surg* 1971; 103:82-83.

Fleming L, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284: R1-12.

Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractaline and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998; 188: 1413-1419.

Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 2003; 362:782- 90.

Fraker TD, Fihn SD Jr. 2007 Chronic Angina focused update of the ACC/AHA 2002 guidelines for the management of patients with chronic stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2264-74.

Franklin, SS, Larson, MG, Khan, SA. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging?: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2001; 103:1245- 52.

Fuster V, Moreno P, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk-plaque. *J Am Coll Card.* 2005; 46: 937-954.

G.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999; 340: 448–454.

Galea J, Armstrong JA, Gadsdon PA, Holden H, Francis SE, Holt CM. Interleukin-1 β in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 1000–1006.

Gao YJ, Hirota S, Zhang DW, Janssen LJ, Lee RM. Mechanisms of hydrogen- peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 2003; 138:1085-1092. (2)

Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br J Pharmacol*. 2001; 134:1639- 1646.

Garcia- Fuster R, Montero JA, Gil O, Hornero F, Canovas SJ, Dalmau MJ, Bueno M. Advantages of off-pump coronary bypass surgery in high-risk patients. *Rev Esp Cardiol*. 2002; 55: 383-390.

Genest, JJ, Martin-Munley, SS, McNamara, JR. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992; 85:2025- 10.

Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol*. 2001; 2: 108-115.

Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999; 398: 718-723.

Cheng M, Hashmi S, Mao X, Zeng QT. Relationships of adiponectin and matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio with coronary plaque morphology in patients with acute coronary syndrome. *Can J Cardiol*. 2008;24:385-90.

Gibbon JH. Applications of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 1954; 37: 171-85.

Gibbons GH, Dzau VJ. Mechanisms of disease: the emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. 1994; 330: 1431-1438.

Gil-Longo J, Gonzalez-Vazquez C. Characterization of four different effects elicited by H₂O₂ in rat aorta. *Vasc Pharmacol*. 2005; 43:128–138.

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987; 316: 1371–1375.

Go AS, Chertow GM, Fan D. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351:1296- 302.

González- Correa JA, Arrebola MM, Guerero A, Cañada MJ, Muñoz-Marín MJ, Sánchez-de la Cuesta F, De La Cruz JP. Antioxidant and antiplatelet effects of the alpha-tocopherol-aspirin combination in type 1 – like diabetic rats. *Life Sci* 2006; 79:1405-12.

Gozin A, Franzini E, Andrieu V, Da Costa L, Rollet-Labelle E, Pasquier C. Reactive oxygen species activate focal adhesion kinase, paxillin and p130cas tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1998; 25: 1021-1032.

Grad, D, Herrington D, Bittner V. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). JAMA 2002; 288:49- 60.

Graves DR, Häkkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Gree FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordion S, Ylä-Hertuala S. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokines, fractaline, and thynus- and activation- regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21: 1923-1929.

Green GE, Stertz SH, Reppert EH. Coronary arterial bypass grafts. Ann Thor Surg. 1968; 5: 443-450.

Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin-1 receptor complex. J Biol Chem. 1995; 270: 13757–13765.

Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20:2175-2183.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in Cardiovascular Biology and Disease. Circ Res. 2000; 86:494-501.

Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en la angina estable. Cir Cardio 2001; 8: 7-36.

Gusik TJ, West NE, Black E,. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. Circ Res. 2000; 86: E85-90.

H.

Hammes HP. Pathofhysiological mechanisms of diabetic angiopathy. J Diabetes Complications. 2003; 17: 16-19.

Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. Am J Cardiol. 2003; 91: 7A-11A.

Hasdai D, Scheinowitz M, Leibovitz E, Sclarovsky S, Eldar M, Barak V. Increased serum concentrations of interleukin-1 β in patients with coronary artery disease. Heart. 1996; 76: 24–28.

Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. Hydrogen peroxideinduced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. Heart Vessels 1998; 13:9-17.

Hehner SP, Breikreutz R, Shubinsky G, Unsoeld H, Schulze-Osthoff K, Schmitz ML, Dröge W. Enhancement of T cell receptor signaling by mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol* 2000; 165:4319-4328.

Henderson B, Higgs GA. Targets for modulating cytokine responses in inflammatory and infectious diseases, in *Novel Cytokine Inhibitors*. Editors. Higgs GA and Henderson B, 2000 pp 1–8, Birkhäuser Verlag AG, Basel.

Herrick J. Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. *JAMA* 1912; 59: 2015-2020.

Hippisley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y. Derivation and validation of QRISK, a new cardiovascular disease risk score for the United Kingdom: prospective open cohort study. *BMJ* 2007; 335:136- 42.

Hippisley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y. Predicting cardiovascular risk in England and Wales: prospective derivation and validation of QRISK2. *BMJ* 2008; 336:1475- 82

Hsich E, Segal BH, Pagano PJ, Rey FE, Paigen B, Deleonardis J, Hoyt RF, Holland SM, Finkel T. Vascular effects following homozygous disruption of p47(phox): An essential component of NADPH oxidase. *Circulation*. 2000; 101: 1234-1236.

Holmlund A, Hulthe J, Millgard J, Sarabi M, Kahan T, Lind L.. Soluble intercellular adhesion molecule-1 is related to endothelial vasodilatory function in healthy individuals. *Atherosclerosis*. 2002; 165: 271-276.

Hörig H, Pullman W. From bench to clinic and back: perspective on the 1st IQPC translational research conference. *Journal of Translational Medicine*. 2004; 2 : 44-52.

Huo Y, Weber C, Forlow SB, Sperandio M, Thatte J, Mack M, Jung S, Littman DR, Ley K. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1307-1314.

I.

Ikonomidis I, Stamatelopoulos K, Lekakis J, Vamvakou GD, Kremastinos DT. Inflammatory and non-invasive vascular markers: the multimarker approach for risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2008;199:3-11.

Ishikawa T, Imamura T, Hatakeyama K, Date H, Nagoshi T, Kawamoto R, Matsuyama A, Asada Y, Eto T. Possible contribution of C reactive protein within coronary plaque to increasing its own plasma levels across coronary circulation. *Am J Cardiol*. 2004; 93: 611–614.

Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, Inoue S, Ni W, Zhao Q, Usui M, Kitamoto S, Ichiki T, Takeshita A. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension*. 2002; 40: 687-693.

J.

Jang Y, Lincoff AM, Plow EF. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 24: 1591–1601.

Jay J. The legacy of Dr William Heberden. *J Insur Med*. 2006;38:75-7.

Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care*. 2001; 24: 1433–1437.

Juni P, Nartey L, Reichenbach S, Sterchi R, Dieppe PA, Egger M. Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. *Lancet*. 2004; 364: 2021-2029.

K.

Kamijikkoku S, Murohara I, Tayama S, Matsuyama K, Honda T, Ando M, Hayasaki K. Acute myocardial infarction and increased soluble intercellular adhesion molecule-1: a marker of vascular inflammation and a risk of early restenosis. *Am Heart J*. 1998; 136: 231–236.

Kannel, WB, McGee, DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: The Framingham Study. *Circulation* 1979; 59:8.

Kannel, WB, McGee, DL. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: The Framingham Study. *Diabetes Care* 1979; 2:120.

Kanter JE, Averill MM, Leboeuf RC, Bornfeldt KE. Diabetes- accelerated atherosclerosis and inflammation. *Circ Res* 2008;10:e116-7.

Kassab E, McFarlane SI, Sowers JR. Vascular complications in diabetes and their prevention. *Vasc Med*. 2001; 6: 249-255.

Kattainen A, Salomaa V, Harkanen T, Jula A, Kaaja R, Kesaniemi YA, Kahonen M, Moilanen L, Nieminen MS, Aromaa A, Reunanen A. Coronary heart disease: from a disease of middle-aged men in the late 1970s to a disease of elderly women in the 2000s. *Eur Heart J*. 2006; 27: 296-301.

Keaney JF. Oxidative stress and the vascular wall: NADPH oxidases take center stage. *Circulation* 2005; 112: 2585–2858.

Keaney JF, Larson M, Vasan R, Wilson P, Lipinskai I, Corey D, Massaro J, Sutherland P, Vita J, Framingham S. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study, *Arterioscler Thromb Vasc. Biol* 2003; 23: 434–439.

King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 1998; 21:1414-1431.

Kiayias JA, Vlachou ED, Theodosopoulou EBN, Lakka-Papadodima E. Rosiglitazone in combination with glimepiride plus metformin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2002; 25: 1251-1252

King SB 3rd, Aversano T, Ballard WL, Beekman RH 3rd, Cowley MJ, Ellis SG, Faxon DP, Hannan EL, Hirshfeld JW Jr, Jacobs AK, Kellett MA Jr, Kimmel SE, Landzberg JS, McKeever LS, Moscucci M, Pomerantz RM, Smith KM, Vetrovec GW, Creager MA, Holmes DR Jr, Newby LK, Weitz HH, Merli G, Piña I, Rodgers GP, Tracy CM. ACCF/AHA/SCAI 2007 update of the Clinical Competence Statement on Cardiac Interventional Procedures: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association/American College of Physicians Task Force on Clinical Competence and Training (Writing Committee to Update the 1998 Clinical Competence Statement on Recommendations for the Assessment and Maintenance of Proficiency in Coronary Interventional Procedures). *Circulation*. 2007;116:98-124.

Kishimoto T. IL-6 from laboratory to bedside. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005; 28: 177-186.

Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleucine -6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*. 1992; 258: 593-597.

Kishimoto T, Mlyake T, Nishizawa Y, Watanabe T, Yamamura Y. Triggering mechanism of B lymphocytes. I. effect of anti-immunoglobulin and enhancing soluble factor on differentiation and proliferation of B cells. *J. Immunol*. 1975; 15: 1179–1184.

Kjærgaard SC, HanseN HT, Fog L, Bülow I, Christensen PD. In hospital outcome for diabetic patients with acute myocardial infarction in the thrombolytic era. *Scan Cardiovasc J*. 1999; 33: 160-170.

Koenig W, Ernst E. The possible role of hemorheology in atherothrombogenesis. *Atherosclerosis*. 1992; 94: 93–107.

Koenig W, Marx N. Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 1804-1809.

Kolesov VI. Mammary artery coronary artery anastomosis as method of treatment for angina pectoris. *J Thor Cardiovasc Surg*. 1967; 54: 535-544.

Kolesov VI, Potashov LV. Operations on the coronary arteries. *Exp Chir Anaesth*. 1965; 10: 3-8.

Kolh P, Wijns W, Danchin N, Di Mario C, Falk V, Folliguet T, Garg S, Huber K, James S, Knuuti J, Lopez-Sendon J, Marco J, Menicanti L, Ostojic M, Piepoli MF, Pirlet C, Pomar JL, Reifart N, Ribichini FL, Schalij MJ, Sergeant P, Serruys PW, Silber S, Sousa Uva M, Taggart D. Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS); European Association for Percutaneous Cardiovascular Interventions. Guidelines on myocardial revascularization. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010; 38:S1-S52.

Koya D, King GL. Protein Kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998; 47: 859-866.

Koki A, Khan NK, Woerner BM, Dannenberg AJ, Olson L, Seibert K, Edwards D, Hardy M, Isakson P, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. *Adv Exp Med Biol*. 2002;66:13–18.

Kozak KR, Crews BC, Morrow JD, Wang LH, Ma YH, Weinander R, Jakobsson PJ, Marnett LJ. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonyl glycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. *J Biol Chem* 2002; 277: 44877–44885.

Krakauer T. Variability in the sensitivity of nine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs) in the measurement of interleukin 6. *J Immunol Methods*. 1998; 219: 161-167.

Krentz AJ, Clough G, Byrne CD. Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab*. 2007;9:781-91.

Kukovetz EM, Bratschitsch G, Hofer HP, Egger G, Schaur RG. Influence of age on the release of reactive oxygen species by phagocytes as measured by a whole blood chemiluminescence assay. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 433–438.

Kuss O, von Salviati B, Börgermann. Off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting: A systematic review and meta-analysis of propensity score analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;140:829-835.

L.

Lamy A, Farrokhyar F, Kent R, Wang X, Smith KM, Mullen JC, Carrier M, Cheung A, Baillot R. Canadian Off-Pump CABG Registry Investigators. The Canadian off-pump coronary artery bypass graft registry: a one-year prospective comparison with on-pump coronary artery bypass grafting. *Can J Cardiol*. 2005; 21:1175-1181.

Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. Clin Biochem 2003; 36: 431–441.

Levinson SS. Brief review and critical examination of the use of hs-CRP for cardiac risk assessment with the conclusion that it is premature to use this test. Clinica Chimica Acta. 2005; 356: 1–8.

Lewington S, Clarke, R, Qizilbash, N. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Lancet 2002; 360:1903- 12.

Li S, Chen W, Srinivasan SR.. Childhood cardiovascular risk factors and carotid vascular changes in adulthood: the Bogalusa Heart Study. JAMA 2003; 290:2271-76.

Li J, Li W, Liu W, Altura BT, Altura BM. Mechanisms of hydroxyl radical-induced contraction of rat aorta. Eur J Pharmacol. 2004; 19:171-178

Libby P. Cap 30 Biología vascular de la aterosclerosis, en Cardiología de Braunwald. Editores: Braunwald e, Zipes DP, Libby P. 6ª.edición 2004, Marban S.L., Madrid.

Libby P. Changing concepts of atherosclerosis. J Intern Med. 2000; 247: 349-358.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002;420: 868-874.

Libby P. Prevention and treatment of atherosclerosis, in *Harrison. Principles of Internal Medicine*, 15th ed., Braunwald E, Fauci A, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds).Philadelphia, Saunders, 2001.

Libby P, Ordovas JM, Birinyi LK, Auger KR, Dinarello CA.. Induction of interleukin-1 expression in human vascular smooth muscle cells. J Clin Invest. 1986; 78: 1432–1438.

Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. Lancet 1999;353:89-92.

Loftus IM, Naylor AR, Bell PRF, Thompson MM. Plasma MMP-9 – a marker of carotid plaque instability. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2001; 21: 17–21.

Longmire WP, Cannon JA, Kattus AA. Direct-vision coronary endarterectomy for angina pectoris. N Engl J Med 1959;259:993-9.

Loppnow H, Libby P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. J Clin Inv. 1990; 85: 731-738.

Lopes-Virella MF. Interactions between bacterial liposaccharides and serum lipoproteins and their possible role in coronary artery disease. Eur Heart J. 1993; 14: 118–124.

Los M, Dröge W, Stricker K, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol.* 1995 ;25:159-65.

Lu Y, Wahl LM. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol.* 2005; 175:5423-5429

Luscinskas FW, Gimbrone MA. Endothelial-dependent mechanisms of mononuclear leukocyte recruitment. *Annu Rev Med.*1996; 47: 413–21.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000; 407: 233–241.

M.

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 29-38.

Maksimowicz-Mckinnon K, Bhatt DL, Calabrese LH. Recent advances in vascular inflammation: C-reactive protein and other inflammatory biomarkers. *Curr Opin Rheumatol.* 2004; 16: 18-24.

Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res.* 1999; 85: e17– e24.

Malmberg K, Yusuf S, Gerstein HC, Brown J, Zhao F, Hunt D, Piegas L, Calvin J, Keltai M, Budaj A, for the OASIS Registry Investigators. Impact of diabetes on long-term prognosis in patients with unstable angina and non-q wave myocardial infarction: results of the oasis (organization to assess strategies for ischemic syndromes) registry. *Circulation.* 2000; 102: 1014-1019.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol.* 1995; 15:279-307.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.* 1997; 75:111-134.

Marin A, Medrano MJ, González J, Pintado H, Compaired V, Bárcena M, Fustero MV, Tisaire J, Cucalón JM, Martín A, Boix R, Hernansanz F, Bueno J. Risk of ischaemic disease and acute myocardial infarction in a Spanish population: Observational prospective study in a primary-care setting. *BMC Public Health.* 2006 ; 17;6:38.

Marinou K, Antoniadou C, Tousoulis D. Homocysteine: a risk factor for coronary artery disease? *Hellenic J Cardiol.* 2005; 46: 59-67.

Mark DB, Knight JD, Cowper PA, Davidson-Ray L, Anstrom KJ. Long-term economic outcomes associated with intensive versus moderate lipid-lowering therapy in coronary artery disease: results from the Treating to New Targets (TNT) Trial. *Am Heart J*. 2008; 156:698-705.

Marklund S. Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand* 1980;492:19-23.

Marrugat J, D'Agostino R, Sullivan L, Elosua R, Wilson P, Ordovas J, Solanas P, Cordon F, Ramos R, Sala J, Masia R, Kannel WB. An adaptation of the framingham coronary heart disease risk function to european mediterranean areas. *J Epidemiol Community Health*. 2003; 57: 634-638.

Mattiaz M, D'Arelio M, Gajewski CD, Mutated SODq causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 2002; 277:29626-33

McDermott DH, Halcox JPJ, Schenke WH, Wacławski MA, Merrel MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM. Association between polymorphism in the chemokine receptor CXC3R1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res*. 2001; 89: 401-407.

McEver R. Adhesive interactions of leukocyte, platelets and vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemostas*. 2001; 86: 746–756.

McGill HC Jr, McMahan GA, Gidding SS. Preventing heart disease in the 21 st century: implications of the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) study. *Circulation* 2008;117:1216-27.

Medrano MJ, Boix R, Cerrato E, Ramírez M. Incidencia y prevalencia de cardiopatía isquémica y enfermedad cerebrovascular en España. Revisión sistemática de la literatura. *Rev Esp Salud Pública* 2006;80:5-15.

Medrano MJ, Cerrato E, Boix R, Delgado-Rodriguez M. Factores de riesgo cardiovascular en la población española: metaanálisis de estudios transversales. *Med Clin*. 2005; 124: 606-612. Mendall MA, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan DP, Camm AJ, Northfield TC. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart* 1997; 78: 273–277.

Merhi-Soussi F, Kwak BR, Magne D, Chadjichristos C, Berti M, Pelli G, James RW, Mach F, Gabay C. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2005; 66: 583–593.

Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957;229:189-97.

Miura K, Daviglius, ML, Dyer, AR. Relationship of blood pressure to 25-year mortality due to coronary heart disease, cardiovascular diseases, and all causes in young adult men: The Chicago Heart Association detection project in industry. *Arch Intern Med* 2001; 161:1501- 9.

Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003. 7:e31-e40

Mora, S, Otvos, JD, Rifai, N, et al. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation* 2009; 119:931.

Moreno A, De La Cruz JP, García-Campos J. Sánchez – De La Cuesta F. Prostacyclin/thromboxane balance and retinal vascular pattern in diabetic rats. *Can J Ophthalmol* 1995; 30:117-123.

Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 2006;99:891-9.

Mueller RL, Rosengart TK, Isom OW. The history of surgery for ischemia heart disease. *Ann Thorac Surg*. 1997; 63: 869-878. (3)

Murabito JM, Pencina MJ, Nam BH. Sibling cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults. *JAMA* 2005; 294:3117- 24

Murray G, Porcheron R, HilariO J, Roschlau W. Anastomosis of systemic artery to the coronary. *Can Med Assoc J*. 1954; 71: 594-597.

Murthy KG, Szabo C, Salzman AL. Cytokines stimulate expression of inducible nitric oxide synthase in DLD-1 human adenocarcinoma cells by activating poly (A) polymerase. *Inflamm Res* 2004; 53: 604–608.

N.

Nashef SAM, Roques F, and the EUROSCORE Study Group. European system for cardiac operative risk evaluation (Euroscore). *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999; 16: 9-13.

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 420: 846-852.

Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993; 328: 1676-1685.

National Cholesterol Education Program. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation* 2002; 106:3143- 50.

Navab M, Berliner JA, Watson AD. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 831-842.

Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*. 1991; 88: 1121–1127.

Niccoli G, Biasucci LM, Biscioni C, Fusco B, Porto I, Leone AM, Rona RD, Dato I, Liuzzo G, Crea F. Independent prognostic value of C-reactive protein and coronary artery disease extent in patients affected by unstable angina. *Atherosclerosis* 2008;196:779-85.

Nissen SE, Tuzcu EM, Libby P. Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: the CAMELOT study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 292:2217- 25.

Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism of diabetic complications. *Kidney Int* 2000; 58:26-30.

Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:1287-1312. (2)

O.

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546-2551.

Okon EB, Chung AW, Rauniyar P, Padilla E, Tejerina T, McManus BM, Luo H, Van Breemen C. Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2005; 54: 2415-2423.

Olesen M, Kwong E, Meztli A, Kontny F, Seljeflot I, Arnesen H, Lyngdorf L, Falk E. No effect of cyclooxygenase inhibition on plaque size in atherosclerosis-prone mice. *Scand Cardiovasc J*. 2002; 36: 362–367.

Otani H, Umemoto M, Kagawa K, Nakamura Y, Omoto K, Tanaka K, Sato T, Nonoyama A, Kagawa T. Protection against oxygen-induced reperfusion injury of the isolated canine heart by superoxide dismutase and catalase. *J Surg Res*. 1986; 41:126-33.

P.

Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*. 2008;54:24-38.

Paffen E, DeMaat MP. C-Reactive protein in atherosclerosis: A causal factor?. *Cardiovasc Res* 2006;71:30-9.

Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JA, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, RIFAI N, Cannuscio CC, Stampfer MJ, Rimm EB. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2599-2610.

Pannitteri G, Marino B, Campa PP, Martucci R, Testa U, Peschle C. Interleukins 6 and 8 as mediators of acute phase response in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1997; 80: 622-625.

Parissis JT, Venetsanou KF, Kalantzi MV, Mentziko DD, KaraS SM. Serum profiles of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and C-C chemokines in hypertensive patients with or without significant hyperlipidemia. *Am J Cardiol*. 2000; 85: 777-779.

Pastor-Barriuso, R, Banegas, JR, Damian, J, Appel, LJ. Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and pulse pressure: An evaluation of their joint effect on mortality. *Ann Intern Med* 2003; 139:731.

Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, Green PS, McDonald TH, Brunzel J, Chait A, Oram JF, O'Brien K, Geary RL, Heinecke JW. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain HDL damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem*. 2004; 279: 42977-42983.

Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: A critical update. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1805-1812. (3)

Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, Van Horn L, Slattery ML, Jacobs DR, Ludwig DS. Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet*. 2005; 365: 36-42.

Polla BS, Bachelet M, Elia G, Santoro MG. Stress proteins in inflammation. *Ann NY Acad Sci* 1998; 851:75-85.

Pradhan AD, Ridker PM. Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *European Heart Journal*. 2002; 23: 831-834.

Pradhan AD, Rifai N, Ridker P. Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men. *Circulation*. 2002; 106: 820-825.

Prescott E, Hippe M, Schnohr P. Smoking and the risk of myocardial infarction in women and men: Longitudinal population study. *BMJ* 1998; 316:1043-49.

Prugger C, Wellmann J, Heidrich J, Brand_herrmann SM, Keil U. Cardiovascular risk factors and mortality in patients with coronary heart disease. *Aur J Epidemiol* 2008; 23:126-134.

R.

Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci.* 2005; 109:217-226.

Redondo S, Ruiz E, Padilla E, Gordillo-Moscoso A, Tejerina T. Role of TGF-beta1 in vascular smooth muscle cell apoptosis induced by angiotensin II. *Eur J Pharmacol.* 2007;556:36-44.

Retnakaran R, Zinman B. Type 1 diabetes, hyperglycemia, and the heart. *Lancet* 2008;371:1790-9.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000; 342: 836-843.

Ridker PM, Paynter NP, Rifai N. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. *Circulation* 2008; 118:2243- 52.

Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E; for the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation.* 2000; 101: 2149-2153.

Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 2000; 101: 1767–1772.

Robbesyn F, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway. *Free Radic Res.* 2004;38:541-51

Rodriguez-Iturbe B, Sepassi L, Quiroz Y, Ni Z, Wallace DC, Vaziri ND. Association of mitochondrial SOD deficiency with salt-sensitive hypertension and accelerated renal senescence. *J Appl Physiol* 2007;102:255-60.

Rodríguez-Martínez MA, García-Cohen EC, Baena AB, González R, Salaices M, Marín J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endotelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol.*

1998; 125:1329-1335

Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Trischler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO- MCBN, the American Diabetes Association, and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2005;17:189-212.

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 115-126. (4 veces)

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362: 801–809.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med*. 1986; 314: 488–500.

Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180: 1332–1339.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321-29.

Rot A, Von Adrian UH. Chemokins in innate and adaptative host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 891-928.

Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H, Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized LDL in human endothelial cells: antioxidative potential of HMG-coenzyme A reductase inhibitor therapy, *Circulation* 2001; 104 : 1767–1772.

Ruel G, Pomerleau S, Couture P, Lamarche B, Couillard C. Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short term cranberry juice consumption.. *Metabolism* 2005;54:856-61

Ruiz E, Gordillo-Moscoso A, Padilla E, Redondo S, Rodriguez E, Reguillo F, Briones AM, van Breemen C, Okon E, Tejerina T. Human vascular smooth muscle cells from diabetic patients are resistant to induced apoptosis due to high Bcl-2 expression. *Diabetes* 2007; 55:1243- 51

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II Activates Nuclear Transcription Factor κ B Through AT₁ and AT₂ in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 2000; 23:578-597.

Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis*, 1996; 127: 263–227.

S.

Saadeddin SM, Habbab MA, Ferns GA. Markers of inflammation and coronary artery disease. *Med Sci Monit* 2002; 8: RA5-RA12.

Sack M. Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and the potential for anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in heart disease. *Pharmacol Ther*. 2002; 94: 123-135.

Sandison A. Degenerative vascular disease in the Egyptian mummy. *Med Hist*. 1962; 6: 77-81.

Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K. 10- Fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1994; 269:19163-6.

Santrůcek M, Krepelka J. Antioxidants from the aspect of their potential use in chemotherapy. *Cesk Farm* 1988;37:121-8.

Saremi A, Anderson RJ, Luo P, Mortiz TE, Schwenke DC, Allison M, Reaven PD, for the Veterans Affairs Diabetes Tiral (VADT). Association between IL-6 and the extent of coronary atherosclerosis in the Veternas Affairs Diabetes Trial (VADT). *Atherosclerosis* 2009; 203:610-4

Segev A, Kassam S, Buller CE, Lau HK, Sparkes JD, Connelly PW, Seidelin PH, Natarajan MK, Cohen EA, Strauss BH. Pre-procedural plasma levels of C-reactive protein and interleukin-6 do not predict late coronary angiographic restenosis after elective stenting. *European Heart Journal*. 2004; 25: 1029-1035.

Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnersen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2002; 162: 179-185.

Senning A. Strip grafting in coronary arteries: report of a case. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1961;41: 542-549.

Sesso HD, Lee IM, Gaziano JM. Maternal and paternal history of myocardial infarction and risk of cardiovascular disease in men and women. *Circulation* 2001; 104:393-399.

Setter SM, Campbell RK, Cahoon CJ. Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus. *Ann Pharmacother*. 2003; 37: 1858-1866.

Shen JZ, Zheng XF, Kwan CY. Differential contractile actions of reactive oxygen species on rat aorta: selective activation of ATP receptor by H₂O₂. *Life Sci* 2000; 14:PL291-PL296

Shindler DM, Palmeri ST, Antonelli TA, Sleeper LA, Boland J, Cocke TP, Hochman JS for the SHOCK investigators. Diabetes mellitus in cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: a report from the SHOCK trial registry. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 1097–1103.

Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress and inflammation. *Annu Re. Nutr* 2005;25:151–174.

Sironi M, Munoz C, Pollicino T, Siboni A, Sciacca F, Bernasconi S, Vecchi A, Colotta F, Mantovani A. Divergent effects of IL-10 on cytokine production by mononuclear phagocytes and endothelial cells. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2692–2695.

Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* 1997; 28:2290-2295

Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest* 2005; 35:305-314.

Soliman A, KeeP. Experimental models investigating the inflammatory basis of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2008;10:260-71.

Sones FM, Shirey EL. Cine coronary arteriography. *Mod Conc Cardiovasc Dis* 1962;31:735-8.

Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 2008;57:2461-9.

Sozmen B, Kazaz C, Trskiran D. Plasma antioxidant status and nitrate levels in patients with hypertension and coronary disease. *Tr J Med Sci* 1998;28: 148-52.

Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez G, Tatge H, Reepschläger N, Hornig B, Drexler H, Harrison DG. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine oxidase activity in patients with coronary artery disease NAD(P)H. relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2003; 107: 383-1389.

Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 827–872.

Srivastava P, Rajanikanth M, Raghavan SA, Dikshit M. Role of endogenous reactive oxygen derived species and cyclooxygenase mediators in 5-hydroxytryptamine-induced contractions in rat aorta: relationship to nitric oxide. *Pharmacol Res* 2002; 45:375- 382.

Stamler J, Vaccaro O, Newton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in a multiple risk factor interventional trial. *Diabetes Care* 1993; 16: 434–444.

Steinbrook R. Facing the diabetes epidemic - mandatory reporting of glycosylated hemoglobin values in New York city. *N Engl J Med* 2006; 354: 545-548.

Stehbens WE. Anitschkow and the cholesterol over-fed rabbit. *Cardiovasc Pathol* 1999; 8: 177–178.

Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347: 781-786.

Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2001; 84 . 1381–1478.

Stocker R, Keaney JF Jr. New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb and Haemost.* 2005; 3: 1825-1834.

Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiothaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol* 1999; 375:139-155.

Sukhija R, Fahdi I, Garza L, Fink L, Scott M, Aude W, Pacheco R, Bursac Z, Grant A, Mehta JL. Inflammatory markers, angiographic severity of coronary artery disease, and patient outcome. *Am J Cardiol* 2007;99:879-84.

Sulistio MS, Zion A, Thukral N, Chilton R. PPARgamma agonists and coronary atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2008 ;10:134-41.

Sutherland AJ, Nataatmadja MI, Walker PJ, Cuttle L, Garlick RB, West MJ. Vascular remodeling in the internal mammary artery graft and association with in situ endothelin-1 and receptor expression *Circulation* 2006; 113: 1180-1188.

Svensson AM, Dellborg M, Abrahamsson P, Karlsson T, Herlitz J, Duval SJ, Berger AK, Luepker RV. *Int J Cardiol* 2007;119:319-25.

T.

Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis. *J Intern Med* 2008;263:489-99.

Tan J, Hua Q, Gao J, Fan Z. Clinical implications of elevated serum interleukin-6, soluble CD40 ligand, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin Cardiol* 2008;31:413-8.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42:1075-1081

Tedgui A, Mallat Z. Anti-Inflammatory Mechanisms in the Vascular Wall. *Circ Res*. 2001; 88: 877-887.

Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006; 86: 515–581.

Tipping PG, Hancock WW. Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol*. 1991; 138: 951-960.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med*. 2003; 329: 977– 986.

Thun MJ, Peto R, Lopez AD.. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly US adults. *N Engl J Med* 1997; 337:1705- 12

Thompson WD, Smith EB. Atherosclerosis and the coagulation system. *J Pathol*. 1989; 159: 97–106.

Torrecillas G, Boyano-Adánez MC, Medina J, Parra T, Grier M, López-Ongil S, Arilla E, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol*. 2001; 59:104-112

Tosaka M, Hashiba Y, Saito N, Imai H, Shimizu T, Sasaki T. Contractile responses to reactive oxygen species in the canine basilar artery in vitro: selective inhibitory effect of MCI-186, a new hydroxyl radical scavenger. *Acta Neurochir (Wien)*. 2002; 144:1305-1310

Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadis C. Assessing inflammatory status in cardiovascular diseases. *Heart*. 2007; 93: 1001- 1007.

Tousoulis D, Böger RH, Antoniades C, Siasos G, Stefanadi E, Stefanadis C. Mechanisms of disease: L-arginine in coronary atherosclerosis—a clinical perspective. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007; 4: 274-283.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004; 44:248-252. (3)

U.

Ungvari Z, Csiszar AQ, Edward JG, Koller A. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase, *Arterioscler Thromb Vasc. Biol* 2003;23: 418–424.

United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet.* 1998; 52: 837–853. (3)

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189:41-54.

V.

Vaccaro O, Eberly LE, Neaton JD. Impact of diabetes and previous myocardial infarction on long-term survival: 25-year mortality follow-up of primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arch Intern Med* 2004; 164:1438- 47.

Vanharanta M, Voutilainen S, Rissanen TH, Adlercreutz H. Risk of cardiovascular disease-related and all-cause death according to serum concentrations of enterolactone: Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Arch Intern Med* 2003; 163:1099- 106.

Van Der Meeren A, Squiban C, Gourmelon P, Lafont H, Gaugler MH. Differential regulation by IL-4 and IL-10 of radiation-induced IL-6 and IL-8 production and ICAM-1 expression by human endothelial cells. *Cytokine.* 1999; 11: 831– 838.

Van Der Meer IM, De Maat MP, Kiliaan AJ, Van Der Kuip DAM, Hofman A, Witteman JCM. The value of reactive C-protein in cardiovascular risk prediction: the rotterdam study. *Arch Med Int.* 2003; 163: 1323-1328.

Van Minkelen R, Wettinger SB, de Visser MC, Vos HL, Reitsma PH. Rosendal FR, Bertina RM, Doggen CJ. Haplotypes of the interleukin-1 receptor antagonist gene, interleukin-1 receptor antagonist mRNA levels and the risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2009; 203:201-5.

Van Oostrom AJH, Van Wijk JPH, Castro- Cabezas M. Lipaemia, inflammation and atherosclerosis: novel opportunities in the understanding and treatment of atherosclerosis. *Drugs* 2004; 64 Suppl: 19-41.

Vasan RS, Sullivan LM, Wilson PW. Relative importance of borderline and elevated levels of coronary heart disease risk factors. *Ann Intern Med* 2005; 142:393- 401.

Vaziri ND. Pathogenesis of lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *J Hypertension* 2002; 20:S15-S20.

Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nature* 2006; 10: 582-93.

Vepa S, Scribner WM, Parinandi NL. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 1999; 277: L150-L158.

Vineberg A, Miller G. Internal mammary coronary anastomosis in the surgical treatment of coronary artery insufficiency. *Can Med Assoc J* 1951;64:204-10.

Viña J, Sastre J, Anton V, Bruseghini L, Esteras A, Asensi M. Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. *EXS* 1992;62:136-44.

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1262–1275.

Von Der Tüsen JH, Kuiper J, Van Berkel TJ, Biessen EA. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 133–166.

Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanidis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 2009;50:402-9.

Vorchheimer DA, Becker R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81: 59-68.

W.

Wagener FADTG, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev*. 2003; 55: 551–571.

Wagenknecht LE, Langefeld CD, Freedman BI, Carr JJ, Bowden DW. A comparison of risk factors for calcified atherosclerotic plaque in the coronary, carotid and abdominal aortic arteries: the diabetes heart study. *Am J Epidemiol* 2007;166:340-7.

Wallace D. Mitochondrial diseases in man and mouse, *Science* 1999; 283: 1482 –1488.

Wang M, Tsai BM, Crisostomo PR, Meldrum DR. Tumor necrosis factor receptor 1 signaling resistance in the female myocardium during ischaemia. *Circulation* 2006;114:1282-9.

Werner GS, Richartz BM, Heinke S, Ferrari M, Figulla HR. Impaired acute collateral recruitment as a possible mechanism for increased cardiac adverse events in patients with diabetes mellitus. *European Heart Journal*. 2003; 24: 1134-1142.

Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice through release of interferon-gamma. *Circ Res*. 2002; 90: e34–e38.

Wilhelmsson C, Vedin JA, Elmfeldt D. Smoking and myocardial infarction. *Lancet* 1975; 1:415- 22.

Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, Swarts SM, Gordon D. Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *J Clin Invest*. 1988; 82: 1134–1143.

Wild S, Sicree R, Roglic G, King H, Green A. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projection for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27: 1047–1053. (2)

Wilkins J, Gallimore R, Moore EG, Pepys MB. Rapid automated high sensitivity enzyme immunoassay of C-reactive protein. *Clin Chem*. 1998; 44: 1358–1361.

Wilson PW, Bozeman SR, Burton TM. Prediction of first events of coronary heart disease and stroke with consideration of adiposity. *Circulation* 2008; 118:124- 130.

Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97:1837- 45.

Wilson PW, Kannel WB. Hypercholesterolemia and Coronary Risk in the Elderly: The Framingham Study. *Am J Geriatr Cardiol* 1993; 2:56-60.

Witztum J, Steinberg D. Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis, *J Clin Invest* 1991; 88: 1785–1792.

Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signalling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1430-1442

Wolk R, Berger P, Lennon RJ. Association between plasma adiponectin levels and unstable coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007; 28:292-9.

Y.

Yacer A, Fernández-Cuenca R, Martínez- De- Aragón M.V. Mortalidad en España en 1998. Evolución en la década 1989-1998.I. Mortalidad general, principales causas de muerte y de años potenciales de vida perdidos. *Boletín Epidemiológico Semanal*. 2001; 9: 241-245.

Yasojima K, Schwab C, McGeer M, McGeer PL. Generation of C Reactive Protein and Complement Components in Atherosclerotic Plaques. *Am J Pathol.* 2001; 158: 1039–1051.

Yu X, Dluz S, Graves DT, Zhang I, Antoniades HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenschein GE. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 6953-6957.

Yudkin JS. Hyperglycaemia as a cardiovascular risk factor in diabetes. *Lancet* 2008;372:1036-7

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937-52.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342:145- 52.